

SKRIPSI

VALIDASI METODE SPEKTROFOTOMETRI UV-Vis ANALISIS TIGA PANJANG GELOMBANG UNTUK PENETAPAN KADAR TABLET PREDNISON YANG MENGANDUNG ZAT PEWARNA



IKA RIZKI HELWANDI

**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
DEPARTEMEN KIMIA FARMASI
SURABAYA
2016**

SKRIPSI

VALIDASI METODE SPEKTROFOTOMETRI UV-Vis ANALISIS TIGA PANJANG GELOMBANG UNTUK PENETAPAN KADAR TABLET PREDNISON YANG MENGANDUNG ZAT PEWARNA



IKA RIZKI HELWANDI

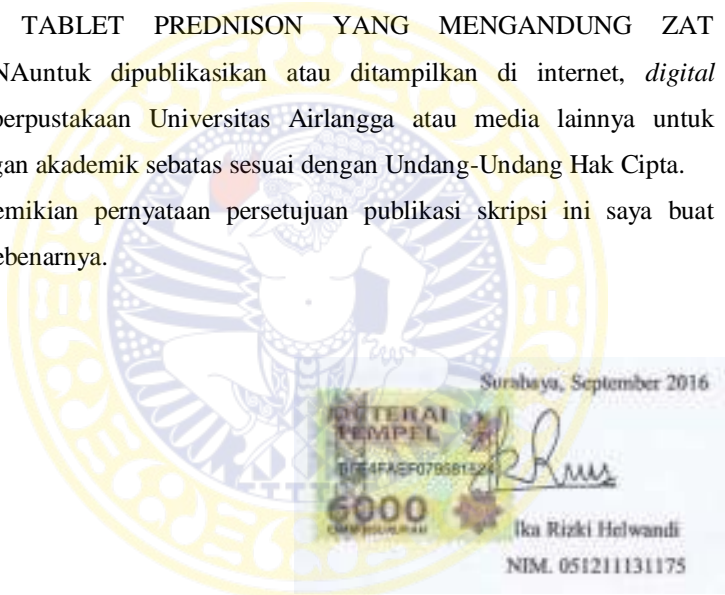
051211131175

**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
DEPARTEMEN KIMIA FARMASI
SURABAYA
2016**

**LEMBAR PERSETUJUAN
PUBLIKASI KARYA ILMIAH**

Demi perkembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui skripsi saya dengan judul: VALIDASI METODE SPEKTROFOTOMETRI UV-Vis ANALISIS TIGA PANJANG GELOMBANG UNTUK PENETAPAN KADAR TABLET PREDNISON YANG MENGANDUNG ZAT PEWARNA untuk dipublikasikan atau ditampilkan di internet, *digital library* perpustakaan Universitas Airlangga atau media lainnya untuk kepentingan akademik sebatas sesuai dengan Undang-Undang Hak Cipta.

Demikian pernyataan persetujuan publikasi skripsi ini saya buat dengan sebenarnya.



SURAT PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Ika Rizki Helwandi

NIM : 051211131175

Fakultas : Farmasi

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa hasil skripsi yang saya tulis dengan judul: **VALIDASI METODE SPEKTROFOTOMETRI UV-Vis ANALISIS TIGA PANJANG GELOMBANG UNTUK PENETAPAN KADAR TABLET PREDNISON YANG MENGANDUNG ZAT PEWARNA** adalah benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri. Apabila dikemudian hari diketahui bahwa skripsi ini menggunakan data fiktif atau merupakan hasil dari plagiatisme, maka saya bersedia menerima sanksi berupa pembatalan kelulusan dan atau pencabutan gelar yang saya peroleh.

Demikian surat pernyataan ini saya buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.



Lembar Pengesahan

**VALIDASI METODE SPEKTROFOTOMERI UV-Vis
ANALISIS TIGA PANJANG GELOMBANG UNTUK
PENETAPAN KADAR TABLET PREDNISON YANG
MENGANDUNG ZAT PEWARNA**

SKRIPSI

**Dibuat Untuk Memenuhi Syarat Mencapai Gelar Sarjana Farmasi
Pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
2016**

Oleh :

IKA RIZKI HELWANDI

NIM : 051211131175

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama



Dr. Riesta Primaharinastiti, S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 197204181997032001

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur bagi sang pencipta semesta, Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul VALIDASI METODE SPEKTROFOTOMETRI UV-Vis ANALISIS TIGA PANJANG GELOMBANG UNTUK PENETAPAN KADAR TABLET PREDNISON YANG MENGANDUNG ZAT PEWARNA dengan baik. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat guna memperoleh gelar sarjana pada program studi di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Selama proses penyelesaian skripsi ini, penulis mendapat banyak dukungan dan juga bantuan dari berbagai pihak, maka pada kesempatan kali ini tak lupa penulis menyampaikan terima kasih dan penghargaan sedalam-dalamnya kepada:

1. Dr. Riesta Primaharinastiti, S.Si., M.Si., Apt., selaku pembimbing utama dan Drs. Marcellino Rudyanto, M.Si., Ph.D., Apt., selaku pembimbing serta menggantikan Setyo Prihatiningtyas, S.Farm., M.Sc., Apt., yang dengan sabar telah memberikan arahan, masukan serta bimbingan selama menyelesaikan skripsi ini.
2. Prof. Dr. Mohammad Nasih, SE., MT., Ak., CMA., selaku rektor Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan untuk menyelesaikan program pendidikan S-1 Farmasi di Universitas Airlangga.
3. Dr. Umi Athijah, M.S., Apt., selaku dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan untuk menyelesaikan program pendidikan S-1 Farmasi di Universitas Airlangga.

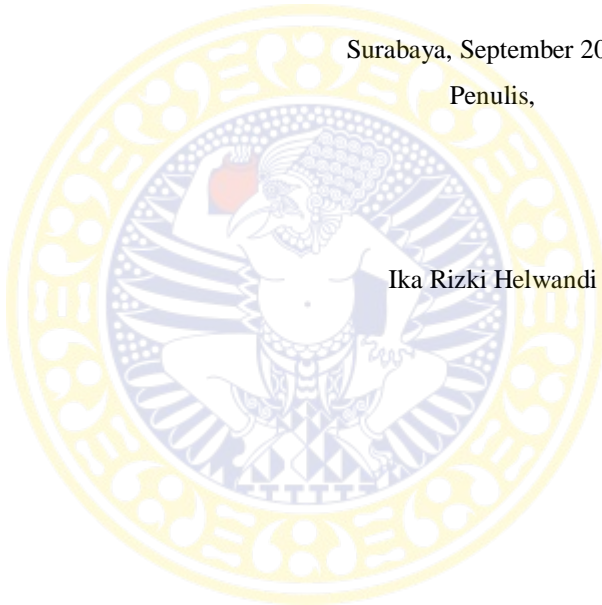
4. Drs. Marcellino Rudyanto, M.Si., Ph.D., Apt., selaku ketua Departemen Kimia Farmasi yang telah membantu dan memberikan kesempatan dalam menyelesaikan skripsi ini.
5. Prof. Dr. Sugijanto, MS., Apt., dan Drs. Hadi Poerwono, M.Sc., Ph.D., Apt., selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan masukan sehingga dapat terselesaikannya skripsi ini.
6. Ana Yuda, S.Si., M.Farm., Apt., selaku dosen wali yang telah membimbing dan memberi arahan selama menjalankan program pendidikan S-1 Farmasi di Universitas Airlangga.
7. Seluruh dosen, karyawan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga dan laboran Ruang Praktikum Analisis Farmasi Departemen Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyelesaian skripsi ini.
8. Bapak dan Ibu, Siswandi dan Siti Rohela serta kedua adik penulis yang selalu memberikan dukungan, dorongan dan doa dalam menyelesaikan skripsi dan selama menjalani program pendidikan S-1 Farmasi di Universitas Airlangga.
9. Para sahabat Ochi, Nurul, Armila, Nina, Ayuning dan anggota kelas B 2012 yang telah memberikan bantuan, dukungan, semangat dan doa.
10. Tim skripsi bu Rista yaitu Dewi, Vista, Ayu, Faza, Lila, Fesha dan Dita atas kerjasamanya selama hampir satu tahun.
11. Semua pihak yang secara langsung dan tidak langsung telah memberikan bantuan dalam penyelesaian skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini tak luput dari kekurangan dan jauh dari sempurna karena kebenaran dan kesempurnaan hanya milik Allah SWT, untuk itu penulis mohon maaf sebesar-besarnya. Penulis berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi siapa saja yang membacanya.

Surabaya, September 2016

Penulis,

Ika Rizki Helwandi



RINGKASAN

VALIDASI METODE SPEKTROFOTOMETRI UV-Vis ANALISIS TIGA PANJANG GELOMBANG UNTUK PENETAPAN KADAR TABLET PREDNISON YANG MENGANDUNG ZAT PEWARNA

IKA RIZKI HELWANDI

Asma merupakan penyakit inflamasi kronik yang menduduki urutan kelima dari sepuluh penyebab kesakitan (morbidity), dimana asma dapat menyebabkan kematian. Terapi farmakologi untuk asma yang paling sering digunakan adalah golongan kortikosteroid seperti prednison. Untuk menjamin tercapainya efek terapi dan keamanan dari tablet prednison maka perlu dilakukan penetapan kadar sebagai kontrol kualitas. Metode penetapan kadar prednison dalam tablet menurut FI V menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Metode analisis menggunakan KCKT memiliki ketelitian dan ketepatan yang tinggi, namun memerlukan biaya besar dan waktu yang lama, sehingga kurang sesuai untuk kontrol kualitas produk obat secara rutin. Dengan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis waktu analisis lebih singkat dan biaya yang lebih rendah namun tetap memberikan ketepatan yang cukup tinggi.

Metode spektrofotometri UV-Vis dapat digunakan untuk penetapan kadar prednison dalam tablet, karena prednison memiliki ikatan rangkap terkonjugasi dan gugus karbonil sebagai gugus kromofor serta gugus OH sebagai gugus aoksokrom. Zat pewarna yang terdapat dalam tablet prednison ternyata juga memiliki gugus kromofor dan aoksokrom sehingga dapat mempengaruhi hasil pengukuran. Untuk mengatasi permasalahan ini, maka digunakan analisis kuantitatif dengan cara pengamatan tiga panjang gelombang. Keuntungan analisis kuantitatif teknik tiga panjang gelombang adalah dapat digunakan untuk analisis zat yang terganggu dengan adanya zat lain dalam campuran sehingga dapat mengurangi kesalahan pengamatan.

Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan validasi metode spektrofotometri UV-Vis analisis tiga panjang gelombang untuk penetapan kadar tablet prednison yang mengandung zat pewarna. Penelitian ini termasuk dalam validasi metode kategori satu karena merupakan prosedur analisis kuantitatif untuk bahan aktif dalam sediaan obat, sesuai dengan

persyaratan yang ada pada FI V. Parameter validasi yang dilakukan adalah selektivitas, linieritas, akurasi dan presisi.

Pada penentuan selektivitas dibuat larutan baku kerja tunggal prednison, *light green* dan tartrazin. Dilakukan *overlay* terhadap spektra dan didapatkan tiga panjang gelombang terpilih yaitu 234 nm, 238 nm dan 242 nm.

Linieritas dilakukan dengan cara membuat larutan baku prednison dengan konsentrasi yang berbeda dan dicampur dengan larutan baku *light green* dan larutan baku tartrazin dengan konsentrasi yang berbeda pula. Didapatkan persamaan regresi $y = 0,0015x - 0,0007$ dengan nilai koefisien korelasi (r) = 0,9997. Diperoleh V_{xo} sebesar 1,18% dan nilai X_p sebesar 0,81 ppm.

Pada akurasi dilakukan dengan menggunakan penambahan larutan baku prednison dengan tiga komposisi yang berbeda (80%, 100% dan 120%) pada plasebo dengan replikasi tiga kali tiap komposisi. Hasil rata-rata % perolehan kembali pada komposisi 80%, 100% dan 120% berturut-turut adalah 99,53%, 99,18% dan 99,63%, sehingga rata-rata % perolehan kembali adalah 99,45%.

Penentuan presisi yang dilakukan adalah *repeatability* dan *intermediate precision*. Didapatkan nilai koefisien variasi untuk *repeatability* adalah 0,76%. Untuk *intermediate precision* didapatkan data nilai KV hari pertama dan hari kedua adalah 0,76% dan 1,04%. Untuk menguji homogenitas kedua data dilakukan uji Hartley dan didapatkan F_{max} hitung adalah 1,8970 (F_{max} tabel = 7,2).

Proses validasi metode spektrofotometri UV-Vis analisis tiga panjang gelombang untuk penetapan kadar tablet prednison yang mengandung zat pewarna memenuhi persyaratan parameter validasi selektivitas, linieritas, akurasi dan presisi (*repeatability* dan *intermediate precision*).

ABSTRACT

VALIDATION OF THREE-WAVELENGTH UV-Vis SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF PREDNISONE TABLET CONTAINING COLOURING AGENTS

IKA RIZKI HELWANDI

The determination of prednisone in tablet is very important to ensure the safety and achieve therapeutic effects of prednisone. However, colouring agents in formulation can frequently affect the drug analysis by background interfering. Therefore, three-wavelength UV-Vis spectrophotometric method was performed to eliminate background interference caused by colouring agents. The aim of this research was to validate three-wavelength UV-Vis spectrophotometric method for determination of prednisone tablet containing colouring agents. Selected wavelength were 234 nm, 238 nm and 242 nm. Calibration graph was linear on the range 5.0-17.0 ppm of prednisone with r value was 0.9997, V_{xo} was 1.18% and X_p was 0.81 ppm. The percentage recovery of prednisone was 99.45%. Coefficient variation of repeatability and intermediate precision were 0.76% and 1.04%.

Keywords: prednisone, validation, three-wavelength, UV-Vis spectrophotometry, colouring agents

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	ii
SURAT PERNYATAAN	iii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
RINGKASAN	viii
<i>ABSTRACT</i>	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xix
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang	1
1.2 Rumusan masalah	6
1.3 Tujuan	6
1.4 Manfaat	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Prednison	7
2.1.1 Sifat fisika kimia	7

2.1.2 Tinjauan farmakologi	8
2.2 Tablet.....	9
2.2.1 Macam tablet berdasar cara pembuatan.....	9
2.2.2 Bahan tambahan tablet	9
2.3 Zat pewarna	10
2.3.1 Sifat fisika kimia <i>light green</i>	12
2.3.2 Sifat fisika kimia tartrazin	14
2.4 Spektrofotometri UV-Vis.....	16
2.4.1 Faktor yang mempengaruhi penyerapan UV-Vis.....	17
2.4.2 Instrumen spektrofotometer UV-Vis	21
2.4.2.1 Sumber radiasi	21
2.4.2.2 Monokromator	22
2.4.2.3 Kuvet	23
2.4.2.4 Detektor	23
2.4.3 Hukum <i>Lambert-Beer</i>	24
2.4.4 Analisis kuantitatif zat tunggal tanpa gangguan latar belakang	25
2.4.5 Analisis kuantitatif zat tunggal dengan gangguan latar belakang	25

2.4.5.1 Derivatif	25
2.4.5.2 Tiga panjang gelombang	27
2.5 Validasi metode.....	29
2.5.1 Spesifisitas	32
2.5.2 Linearitas	32
2.5.3 Akurasi	34
2.5.4 Presisi	36
2.5.5 Rentang (<i>Range</i>)	38
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL.....	39
3.1 Uraian kerangka konseptual	39
3.2 Skema kerangka konseptual	42
BAB IV METODE PENELITIAN.....	43
4.1 Alat dan bahan penelitian	43
4.1.1 Bahan	43
4.1.2 Alat	43
4.2 Kerangka operasional	44
4.3 Prosedur penelitian	45
4.3.1 Pembuatan larutan baku induk <i>light green</i>	45
4.3.2 Pembuatan larutan baku induk tartrazin.....	45

4.3.3 Pembuatan larutan baku induk prednison	45
4.3.4 Pembuatan larutan baku kerja tunggal untuk selektivitas	46
4.3.5 Pembuatan larutan baku kerja campuran untuk linieritas	46
4.3.6 Keseragaman bobot	48
4.3.7 Pembuatan larutan sampel untuk akurasi dan presisi	49
4.4 Prosedur validasi	50
4.4.1 Selektivitas dan pemilihan panjang gelombang terpilih	50
4.4.2 Linieritas.....	50
4.4.3 Akurasi	51
4.4.4 Presisi	51
BAB V HASIL PENELITIAN	52
5.1 Selektivitas dan pemilihan panjang gelombang terpilih	52
5.2 Linieritas	53
5.3 Akurasi	54
5.4 Presisi	55
BAB VI PEMBAHASAN	59
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN.....	64

7.1 Kesimpulan	64
7.2 Saran	64
DAFTAR PUSTAKA	65
LAMPIRAN	70



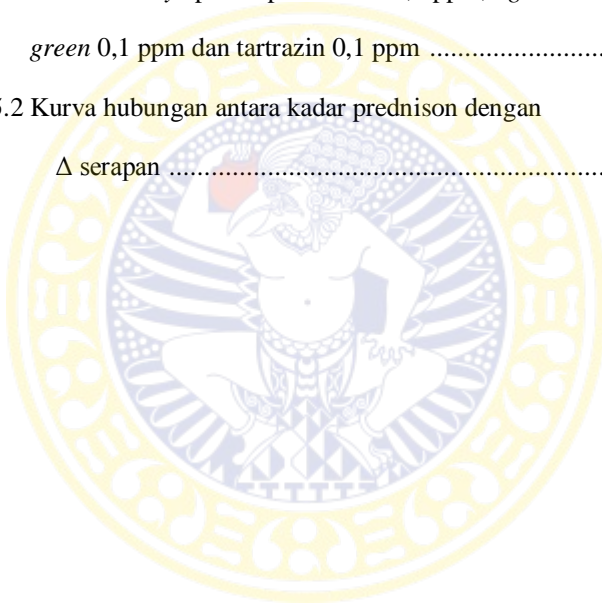
DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel II.1 Bahan pewarna sintetis yang diijinkan di Indonesia.....	11
Tabel II.2 Radiasi elektromagnetik	17
Tabel II.3 Karakteristik berbagai macam kromofor	18
Tabel II.4 Macam pelarut dan panjang gelombang minimal pelarut tidak menyerap sinar UV	19
Tabel II.5 Parameter yang dilakukan untuk validasi	31
Tabel II.6 Kriteria penerimaan akurasi dan presisi	36
Tabel II.7 Macam-macam presisi dan perbedaan	37
Tabel IV.1 Penyimpangan bobot rata-rata tablet	49
Tabel IV.2 Komposisi prednison dan plasebo	49
Tabel V.1 Data hubungan antara kadar prednison dengan Δ serapan	53
Tabel V.2 Data hasil % <i>recovery</i> prednison	55
Tabel V.3 Data hasil <i>repeatability</i>	56
Tabel V.4 Data hasil <i>intermediate precision</i>	57
Tabel V.5 Data hasil uji Hartley.....	58

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1.1 Struktur prednison	3
Gambar 1.2 Struktur <i>light green</i>	5
Gambar 1.3 Struktur tartrazin	5
Gambar 2.1 Struktur prednison	7
Gambar 2.2 Profil spektra UV-Vis prednison dalam pelarut metanol	8
Gambar 2.3 Struktur <i>light green</i>	12
Gambar 2.4 Profil spektra UV-Vis <i>light green</i> dalam pelarut air	13
Gambar 2.5 Profil spektra UV-Vis <i>light green</i> (10 ppm) dalam pelarut metanol	13
Gambar 2.6 Struktur tartrazin	14
Gambar 2.7 Profil spektra UV-Vis tartrazin dalam pelarut air.....	15
Gambar 2.8 Profil spektra UV-Vis tartrazin (10 ppm) dalam pelarut metanol.....	15
Gambar 2.9 Profil <i>overlay</i> spektra UV-Vis prednison, tartrazin dan <i>light green</i> dalam pelarut metanol	16
Gambar 2.10 Komponen spektrofotometer	21
Gambar 2.11 Mencari beda serapan (ΔA) dua panjang gelombang	26

Gambar 2.12 Perbedaan spektra derivatif (a) dengan spektra serapan standar (b).....	27
Gambar 2.13 Mencari beda serapan (ΔA) tiga panjang gelombang	28
Gambar 2.14 Prinsip pengamatan tiga panjang gelombang	29
Gambar 5.1 Profil <i>overlay</i> spektra prednison 10,0 ppm, <i>light green</i> 0,1 ppm dan tartrazin 0,1 ppm	52
Gambar 5.2 Kurva hubungan antara kadar prednison dengan Δ serapan	54



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Perhitungan linieritas	70
Lampiran 2 Hasil keseragaman bobot	74
Lampiran 3 Perhitungan akurasi	75
Lampiran 4 Perhitungan presisi	76
Lampiran 5 t tabel	77
Lampiran 6 F_{\max} tabel menurut uji Hartley	78
Lampiran 7Sertifikat analisis prednison	79
Lampiran 8Sertifikat analisis <i>light green</i>	80
Lampiran 9Sertifikat analisis tartrazin.....	81

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 LATAR BELAKANG

Asma merupakan penyakit inflamasi kronik yang menduduki urutan kelima dari sepuluh penyebab kesakitan (morbiditas), dimana asma dapat menyebabkan kematian. Angka prevalensi bervariasi secara mencolok di antara berbagai negara, hal ini disebabkan karena pendekatan diagnosisnya yang berbeda. Prevalensi asma di Inggris adalah 5% pada orang dewasa dan 10% pada anak-anak. Prevalensi pasien asma anak dan dewasa di Indonesia diperkirakan sekitar 3%-8% (Jumiati, 2014).

Terapi farmakologi untuk asma yang paling sering digunakan adalah golongan kortikosteroid sebesar 36,31%, golongan *short acting beta2-agonis* (SABA) sebesar 29,05%, golongan metilksantin sebesar 27,37% (Adhitya, 2012). Kortikosteroid merupakan anti-inflamasi yang identik dengan kortisol, hormon steroid alami pada manusia yang disintesis dan disekresi oleh korteks adrenal. Kortikosteroid merangsang pelepasan mediator anti-inflamasi yaitu *nitric oxide* (NO). Kortikosteroid selain sebagai anti-inflamasi juga memiliki efek immunosupresif karena menurunkan respon imun seluler (Katzung *et al.*, 2012; Sitompul, 2011). Kortikosteroid yang umum digunakan untuk pengobatan asma adalah prednison dan prednisolon, dosis terapi 1-2 mg per kg per hari selama 3-5 hari (Parikh *et al.*, 2015).

Kortikosteroid meskipun efektif dalam mengatasi peradangan akut, efek samping yang dimiliki seperti osteoporosis, hiperglikemia, dan hipertensi membuat penggunaan kortikosteroid sistemik jangka panjang menjadi terbatas (McGee *et al.*, 2002; Anonim, 2012). Prevalensi fraktur akibat osteoporosis pada penggunaan kortikosteroid jangka panjang sekitar

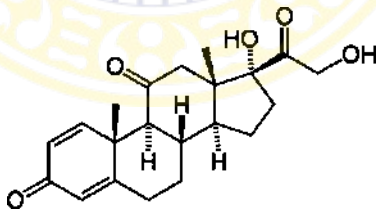
17% (Setyorini *et al.*, 2009). Osteoporosis terjadi karena kortikosteroid menghambat aktivitas osteoblas dan menginduksi apoptosis osteoblas serta osteosit. Osteoporosis terutama terjadi pada pasien yang menerima kortikosteroid dengan dosis yang setara dengan prednison > 5 mg/hari. Pengukuran densitas tulang dianjurkan untuk pasien yang akan menerima kortikosteroid dengan dosis ekuivalen prednison > 7,5 mg/hari selama lebih dari 1-3 bulan (Sitompul, 2011).

Penetapan kadar prednison untuk menjamin tercapainya efek terapi dan keamanan dari produk obat perlu dilakukan sebagai kontrol kualitas. Persyaratan kadar prednison dalam tablet sesuai Farmakope Indonesia edisi lima (FI V) adalah tidak kurang dari 90% dan tidak lebih dari 110% dari jumlah yang tertera di etiket. Metode penetapan kadar prednison dalam tablet menurut FI V menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Fase gerak yang digunakan adalah campuran dari air, tetrahidrofur bebas peroksida dan metanol dengan perbandingan 688:250:62 dan menggunakan larutan asetanilida 110 mg/mL sebagai standar internal. Sedangkan untuk uji disolusi tablet prednison, sebanyak 10 mg prednison dilarutkan dalam 500 mL air dengan kecepatan pengadukan 50 *rotation per minute* (rpm) selama 30 menit dan dianalisis menggunakan detektor UV 242 nm (Depkes RI, 2014).

Metode analisis menggunakan KCKT memiliki ketelitian dan ketepatan yang tinggi, namun memerlukan biaya besar dan waktu yang lama, sehingga kurang sesuai untuk kontrol kualitas produk obat secara rutin (Skoog *et al.*, 2007; Khosayand *et al.*, 2010). Perlu dicari metode alternatif yang membutuhkan waktu analisis lebih singkat dengan biaya yang lebih rendah namun tetap memberikan ketepatan yang cukup tinggi. Metode alternatif tersebut adalah metode spektrofotometri UV-Vis (Skoog *et al.*, 2007; Amalia *et al.*, 2011; Djalil *et al.*, 2014). Spektrofotometri UV-

Vis dapat digunakan untuk analisis kuantitatif berbagai bahan aktif dengan komponen tunggal atau multikomponen dengan menggunakan teknik pengukuran pada panjang gelombang maksimum, teknik serapan individual, teknik grafik, teknik persamaan simultan, teknik perbandingan serapan atau analisis Q_{90} dari Pernarowski, teknik panjang gelombang ganda, teknik diferensial, teknik pengamatan tiga panjang gelombang, teknik derivatif, dan teknik kalibrasi tiap-tiap komponen dengan larutan standart (Mulja dan Suharman, 1995).

Syarat senyawa yang dapat dianalisis menggunakan spektrofotometri UV-Vis adalah senyawa yang mengandung gugus kromofor dan aoksokrom. Gugus kromofor merupakan gugus atau atom dalam senyawa organik yang dapat memberikan serapan pada daerah ultra-violet dan sinar tampak. Gugus aoksokrom merupakan gugus fungsional yang mempunyai elektron bebas (Skoog *et al.*, 2007; Gandjar dan Rohman, 2012). Dilihat dari strukturnya, prednison memiliki ikatan rangkap terkonjugasi dan gugus karbonil sebagai gugus kromofor, gugus OH sebagai gugus aoksokrom sehingga dapat dianalisis menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis.

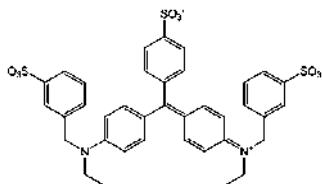


Gambar 1.1 Struktur prednison
(Depkes RI, 2014)

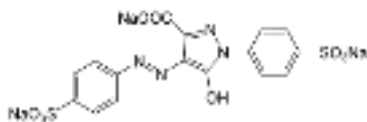
Metode spektrofotometri UV-Vis telah digunakan pada penelitian-penelitian sebelumnya tentang prednison dan terbukti dapat memberikan

hasil yang baik, contohnya pada uji disolusi untuk membandingkan formulasi *sugar solid dispersion system* tablet prednison serta uji disolusi prednison *Intercalated Mg-Al-Layered Double Hydroxide* (Allen *et al.*, 1977; Li *et al.*, 2009). Singh dan Verma juga telah melakukan penelitian penetapan kadar prednison dalam tablet menggunakan reaksi warna yang terjadi setelah prednison direaksikan dengan FeCl_3 dan $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ sehingga membentuk warna hijau kebiruan kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 780 nm dan diperoleh hasil dengan ketepatan dan presisi yang tinggi (Singh dan Verma, 2008). Hal ini menunjukkan bahwa metode spektrofotometri UV-Vis dapat diterapkan untuk penetapan kadar prednison.

Tablet prednison dalam formulasi tidak hanya mengandung bahan aktif namun juga mengandung bahan tambahan seperti bahan pengisi, bahan pengikat, disintegran, lubrikan, glidan dan bahan pewarna (Depkes RI, 2014). Penambahan zat pewarna pada sediaan obat bertujuan untuk identifikasi produk dalam tahap produksi dan distribusi, pembeda dosis pada obat yang sama, mencegah pemalsuan produk, dan indikator stabilitas (Rowe *et al.*, 2009). Zat pewarna yang digunakan dalam penelitian ini adalah campuran *light green* dan tartrazin sehingga menghasilkan warna hijau muda. Zat pewarna ternyata juga memiliki gugus kromofor dan auksokrom yang dapat memberikan serapan pada daerah UV-Vis sehingga apabila dilakukan analisis kadar tablet prednison menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum prednison, maka serapan dari zat pewarna akan mempengaruhi hasil pengukuran.



Gambar 1.2 Struktur *light green*
(pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)



Gambar 1.3 Struktur tartrazin
(pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

Untuk mengatasi permasalahan ini, maka digunakan analisis kuantitatif dengan cara pengamatan tiga panjang gelombang. Keuntungan analisis kuantitatif teknik tiga panjang gelombang adalah dapat digunakan untuk analisis zat yang terganggu dengan adanya zat lain dalam campuran sehingga dapat mengurangi kesalahan pengamatan, analisis lebih cepat dan lebih mudah daripada menggunakan reaksi warna dengan FeCl₃ dan K₄Fe(CN)₆ (Mulja dan Suharman, 1995; Singh dan Verma, 2008).

Metode penetapan kadar prednison dalam tablet yang mengandung zat pewarna menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan pengamatan tiga panjang gelombang perlu divalidasi terlebih dahulu sebelum digunakan untuk analisis rutin. Validasi metode analisis adalah proses yang ditetapkan melalui kajian laboratorium bahwa karakteristik kinerja prosedur tersebut telah memenuhi persyaratan sesuai dengan tujuan penggunaannya. Validasi harus dilakukan terhadap metode non-standar dan metode yang dikembangkan laboratorium, berguna untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reproduisible pada kisaran analit yang dianalisis (Riyanto, 2014; Ganjar dan Rohman 2007; Depkes RI, 2014).

Ada 4 kategori untuk validasi metode. Kategori satu adalah prosedur analisis kuantitatif untuk bahan aktif dalam sediaan obat. Kategori dua

adalah prosedur analisis untuk penentuan cemaran atau hasil degradasi bahan aktif dalam sediaan obat. Kategori tiga adalah prosedur analisis untuk penentuan karakteristik. Kategori empat adalah tes identifikasi (Depkes RI, 2014). Seperti yang dijabarkan di atas, penetapan kadar prednison dalam sediaan tablet termasuk dalam validasi metode kategori satu, sehingga parameter validasi yang perlu ditentukan adalah akurasi, presisi, spesifisitas/selektivitas, linieritas dan rentang (Depkes RI, 2014).

1.2 Rumusan masalah

Apakah metode spektrofotometri UV-Vis analisis tiga panjang gelombang memenuhi persyaratan validasi untuk penetapan kadar tablet prednison yang mengandung zat pewarna?

1.3 Tujuan

Menentukan validasi metode spektrofotometri UV-Vis analisis tiga panjang gelombang untuk penetapan kadar tablet prednison yang mengandung zat pewarna.

1.4 Manfaat

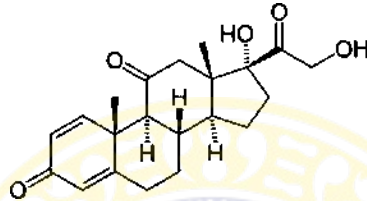
Memberikan metode analisis alternatif untuk penetapan kadar tablet prednison yang mengandung zat pewarna menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis analisis tiga panjang gelombang.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Prednison

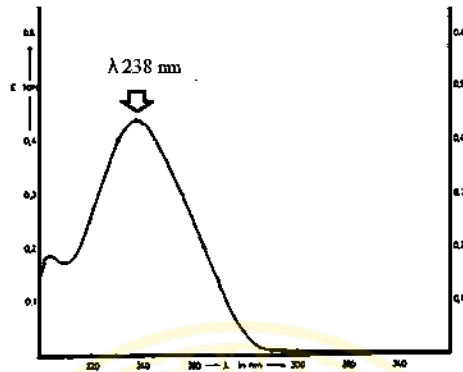
2.1.1 Sifat fisika kimia



Gambar 2.1 Struktur prednison
(Depkes RI, 2014)

Nama kimia	: 17,21-dihidroksipregna-1,4-diena-3,11,20-trion
Sinonim	: prednisonum
Rumus molekul	: $C_{21}H_{26}O_5$
Berat molekul	: 358,428 g/mol
Pemerian	: serbuk hablur atau praktis putih, tidak berbau
Kelarutan	: sangat sukar larut dalam air; sukar larut dalam etanol, dalam kloroform, dalam dioksan, dalam metanol
Koefisien partisi	: 1,46 (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)
Titik lebur	: 230°C (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)
Panjang λ maksimum	: 238 nm pada pelarut metanol (Dibbern <i>et al.</i> , 2002)

(Depkes RI, 2014)



Gambar 2.2 Profil spektra UV-Vis prednison dalam pelarut metanol (Dibbern *et al.*, 2002)

2.1.2 Tinjauan farmakologi

Prednison merupakan kortikosteroid sintetik yang umumnya dikonsumsi oral dan dapat pula melalui injeksi intra muskular, intra rektal dan juga topikal. Prednison akan diubah menjadi prednisolon di hati. Prednison efektif digunakan sebagai immunosupresan dan dapat mempengaruhi sistem imun tubuh. Prednison dapat diberikan pada pasien penyakit autoimun, penyakit inflamasi (asma, alergi berat, lupus eritematosus sistemik, artritis reumatoid, dan sebagainya), uveitis, serta untuk mencegah reaksi penolakan pada transplantasi jantung (Katzung *et al.*, 2012).

Efek jangka pendek yang dapat terjadi pada penggunaan prednison yang tidak sesuai dosis seperti peningkatan kadar gula darah terutama pada pasien diabetes melitus, retensi cairan, insomnia, serta euphoria. Efek jangka panjang diantaranya osteoporosis, sindroma *cushing*, glukoma, diabetes melitus tipe 2, migrin, nyeri perut serta peningkatan berat badan (Sweetman, 2009).

2.2. Tablet

Tablet adalah sediaan padat mengandung bahan obat dengan atau tanpa bahan pengisi. Berdasarkan metode pembuatan, dapat digolongkan sebagai tablet cetak dan tablet kempa. Sebagian besar tablet dibuat dengan cara pengempaan dan merupakan bentuk sediaan yang paling banyak digunakan (Depkes RI, 2014).

2.2.1 Macam tablet berdasar cara pembuatan

1) Tablet kempa, dibuat dengan memberikan tekanan tinggi pada serbuk atau granul menggunakan cetakan baja. Tablet dapat dibuat dalam berbagai ukuran, bentuk dan penandaan permukaan tergantung pada desain cetakan.

2) Tablet cetak, dibuat dengan cara menekan massa serbuk lembab dengan tekanan rendah ke dalam lubang cetakan. Kepadatan tablet tergantung pada ikatan kristal yang terbentuk selama proses pengeringan selanjutnya dan tidak tergantung pada kekuatan tekanan yang diberikan (Depkes RI, 2014).

2.2.2 Bahan tambahan tablet

1) Bahan pengisi, ditambahkan jika jumlah zat aktif sedikit atau sulit dikempa. Bahan pengisi tablet yang umum adalah laktosa, pati, kalsium fosfat dibasa dan selulosa mikrokristal.

2) Bahan pengikat, untuk memberikan daya adhesi pada massa serbuk sewaktu granulasi dan pada tablet kempa serta menambah daya kohesi yang telah ada pada bahan pengisi. Zat pengikat dapat ditambahkan dalam bentuk kering, tetapi lebih efektif jika ditambahkan dalam larutan.

3) Disintegran, membantu hancurnya tablet setelah ditelan. Disintegran tablet yang paling banyak digunakan adalah pati. Kandungan disintegran, cara penambahan dan derajat kepadatan berperan dalam efektivitas daya hancur tablet.

4) Lubrikan, mengurangi gesekan selama proses pengempaan tablet dan juga berguna untuk mencegah massa tablet melekat pada cetakan. Pada umumnya lubrikan bersifat hidrofob, sehingga cenderung menurunkan kecepatan disintegrasi dan disolusi tablet.

5) Glidan, bahan yang dapat meningkatkan kemampuan mengalir serbuk, umumnya digunakan dalam kempa langsung tanpa proses granulasi.

6) Bahan pewarna yang diizinkan sering ditambahkan pada formulasi tablet untuk menambah nilai estetik atau untuk identitas produk. (Depkes RI, 2014).

2.3 Zat pewarna

Zat pewarna digunakan terutama untuk memberikan penampilan yang khas kepada bentuk sediaan farmasi. Kategori utama bentuk sediaan yang diberi warna adalah tablet, kapsul (keras maupun lunak), sediaan likuid dan sediaan topikal.

Fungsi warna pada sediaan farmasi (Rowe *et al.*, 2009):

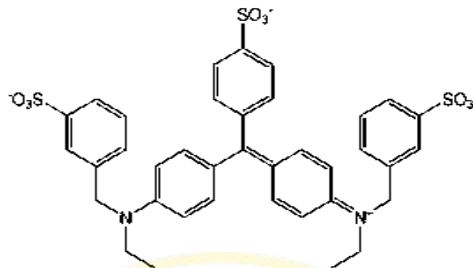
- 1) Identifikasi produk dalam tahap produksi dan distribusi
- 2) Pada pasien yang menggunakan beberapa produk sekaligus, warna dapat mempermudah pasien dalam membedakan obat
- 3) Pada obat yang sama, warna sebagai pembeda dosis
- 4) Mencegah pemalsuan produk

Peraturan mengenai penggunaan zat pewarna yang diijinkan untuk pangan di Indonesia diatur melalui Peraturan Menteri Kesehatan RI Nomor 033 tahun 2012 mengenai bahan tambahan pangan.

Tabel II.1 Bahan pewarna sintetis yang diijinkan di Indonesia
(Peraturan Menteri Kesehatan RI Nomor 033 tahun 2012)

Pewarna		Nomor Indeks Warna (C.I.No.)	Batas Maksimum Penggunaan
Tartrazin	<i>Tartrazine</i>	19140	Secukupnya
Kuning kuinolin	<i>Quinoline yellow</i>	47005	Secukupnya
Kuning FCF	<i>Sunset yellow FCF</i>	15985	Secukupnya
Karmoisin	<i>Carmoisine</i>	14720	Secukupnya
Ponceau 4R	<i>Ponceau 4R</i>	16255	Secukupnya
Eritrosin	<i>Erythrosine</i>	45430	Secukupnya
Merah allura	<i>Allura red</i>	16035	Secukupnya
Indigotin	<i>Indigotine</i>	73015	Secukupnya
Biru berlian FCF	<i>Brilliant blue FCF</i>	42090	Secukupnya
Hijau FCF	<i>Fast green FCF</i>	42053	Secukupnya
Coklat HT	<i>Brown HT</i>	20285	Secukupnya

2.3.1 Sifat fisika kimialight green



Gambar 2.3 Struktur *light green*
(pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

Nama kimia : disodium;3-[[N-ethyl-4-[[4-[ethyl-
[(3-sulfonatophenyl)methyl]azaniumylidene]cyclohexa-
2,5-dien-1-ylidene]-
(4-sulfonatophenyl)methyl]anilino]methyl]
benzenesulfonate

Sinonim : C.I 42095; *Acid Green 5*; *food green 2*

Rumus molekul : $C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3^-$

Berat molekul : 792,122 g/mol

Pemerian : serbuk ungu tua atau serbuk coklat kemerahan
bila dilarutkan dalam air berwarna hijau

Kelarutan : 2 mg/mL etanol; 100 mg/mL air

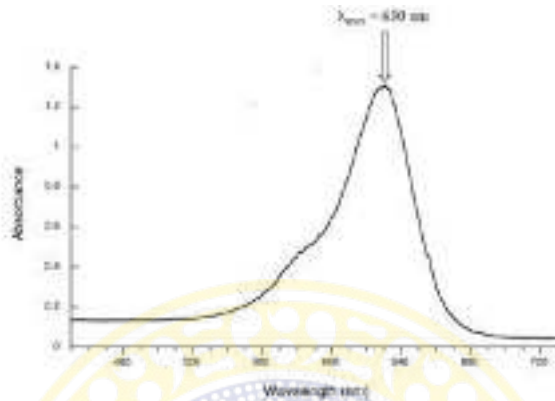
Koefisien : 288°C

partisi

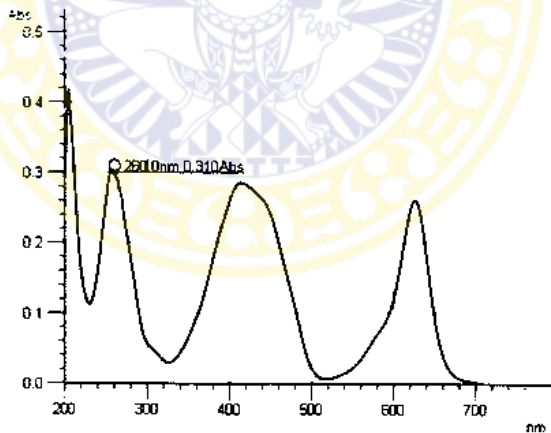
Panjang λ : 630 nm (dalam air)

maksimum

(pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

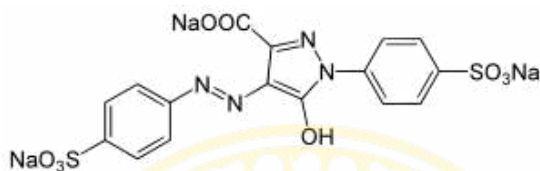


Gambar 2.4 Profil spektra UV-Vis *light green* dalam pelarut air (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)



Gambar 2.5 Profil spektra UV-Vis *light green* (10 ppm) dalam pelarut metanol

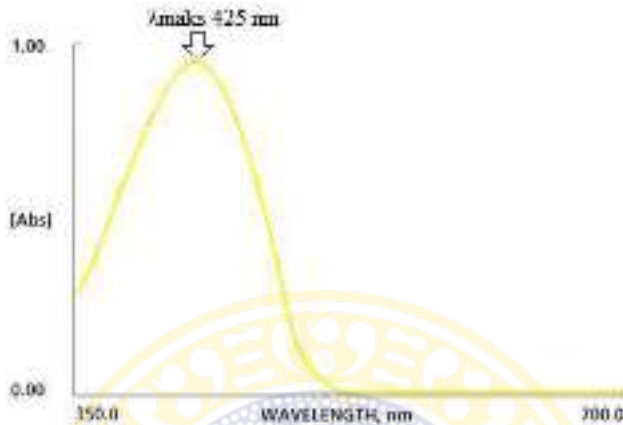
2.3.2 Sifat fisika kimia tartrazin



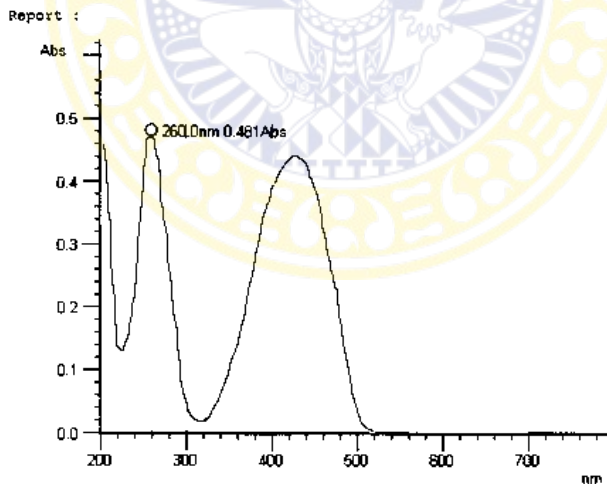
Gambar 2.6 Struktur tartrazin
(pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

Nama kimia	: trisodium;5-oxo-1-(4-sulfonatophenyl)-4- [(4-sulfonatophenyl)diazenyl]-4H-pyrazole-3- carboxylate
Sinonim	: C.I 19140; yellow 5
Rumus molekul	: $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$
Berat molekul	: 534,363 g/mol
Pemerian	: serbuk kuning
Kelarutan	: 20,0 mg/100 mL air; 18,0 mg/100 mL gliserol; 7,0 mg/100 mL propilen glikol; 0,8 mg/ mL etanol
Koefisien partisi	: -10,17
Panjang λ maksimum	: 425 nm (dalam air)

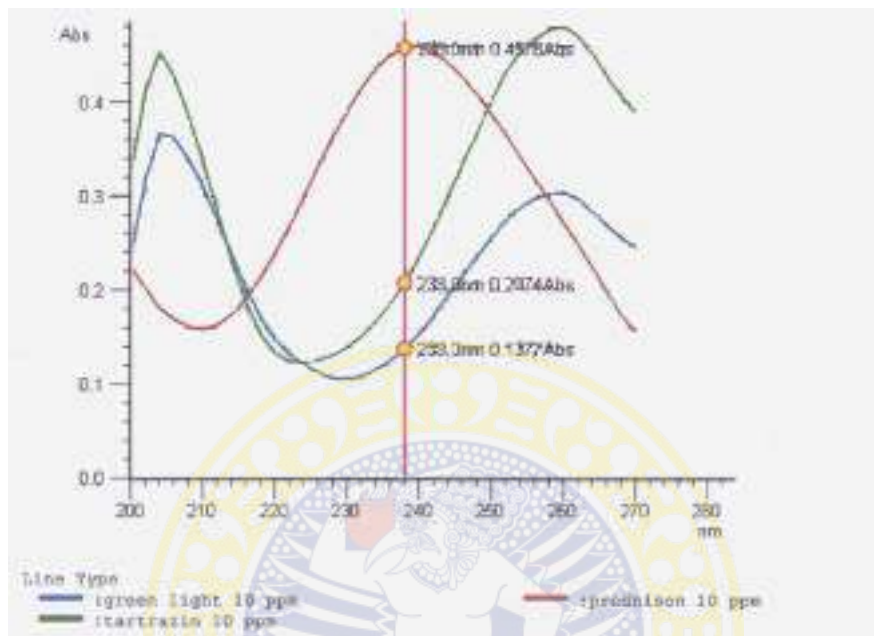
(pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)



Gambar 2.7 Profil spektra UV-Vis tartrazin dalam pelarut air (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)



Gambar 2.8 Profil spektra UV-Vis tartrazin (10 ppm) dalam pelarut metanol



Gambar 2.9 Profil *overlay* spektra UV-Vis prednison, tartrazin dan *light green* dalam pelarut metanol

2.4 Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis merupakan salah satu teknik analisis spektroskopi yang memakai sumber radiasi elektromagnetik ultraviolet dekat (190-380 nm) dan sinar tampak (380-780 nm) dengan memakai instrumen spektrofotometer (Mulja dan Suharman, 1995; Cazes, 2005).

Tabel II.2 Radiasi elektromagnetik
(Mulja dan Suharman, 1995)

Macam sinar	Panjang gelombang
Sinar X	10-100 pkm
Ultra-violet jauh	10-200 nm
Ultra-violet dekat	200-400 nm
Sinar tampak	400-750 nm
Infra-merah dekat	0,75-2 μ m
Infra-merah tengah	2,5-50 μ m
Infra-merah jauh	50-1000 μ m
Gelombang mikro	0,1-100 cm
Gelombang radio	1-1000 m

Spektrofotometri UV-Vis melibatkan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis, sehingga spektrofotometri UV-Vis lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif (Skoog *et al.*, 2007; Mulja dan Suharman, 1995).

2.4.1 Faktor yang mempengaruhi penyerapan UV-Vis

1) Kromofor

Kromofor merupakan semua gugus atau atom dalam senyawa organik yang mampu menyerap sinar ultra-violet dan sinar tampak. Beberapa contoh kromofor dan panjang gelombang maksimalnya:

Tabel II.3 Karakteristik berbagai macam kromofor
(Skoog *et al.*, 2007)

Kromofor	Contoh	Pelarut	λ_{maks} (nm)	ϵ_{maks}	Tipe transisi
Alkena	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{CH}=\text{CH}_2$	n-Heptana	177	13.000	$\pi \rightarrow \pi^*$
Alkuna	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{C}\equiv\text{CCH}_3$	n-Heptana	178	10.000	$\pi \rightarrow \pi^*$
			196	2.000	—
			225	160	—
Karbonil	$\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$	n-Heksana	186	1.000	$n \rightarrow \sigma^*$
			280	16	$n \rightarrow \pi^*$
Karboksil	CH_3COOH	Etanol	204	41	$n \rightarrow \pi^*$
Amida	$\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$	Air	214	60	$n \rightarrow \pi^*$
Azo	$\text{CH}_3\text{N}=\text{NCH}_3$	Etanol	339	5	$n \rightarrow \pi^*$
Nitro	CH_3NO_2	Isoktana	280	22	$n \rightarrow \pi^*$
Nitroso	$\text{C}_4\text{H}_4\text{NO}$	Etil eter	300	100	—
			665	20	$n \rightarrow \pi^*$
Nitrat	$\text{C}_2\text{H}_5\text{ONO}_2$	Dioksan	270	12	$n \rightarrow \pi^*$

Selain kromofor, pada molekul organik juga dikenal istilah auksokrom yang merupakan gugus fungsional yang mempunyai elektron bebas, seperti: -OH, -O, NH_2 dan -OCH. Terikatnya gugus auksokrom pada gugus kromofor akan mengakibatkan pergeseran pitaabsorpsi menuju ke panjang gelombang yang lebih besar (Gandjar dan Rohman, 2012; Pavia *et al.*, 2009).

2) Pemilihan pelarut

Spektrum serapan UV sebagian besar tergantung pada pelarut yang digunakan untuk melarutkan obat. Suatu obat akan menyerap sinar UV secara maksimal pada suatu pelarut dan menyerap sinar UV secara minimal pada pelarut yang lain, sehingga pemilihan pelarut sangat penting (Gandjar dan Rohman, 2012).

Kriteria pemilihan suatu pelarut:

a. Tidak menyerap sinar UV pada daerah yang sama dengan daerah obat akan dianalisis. Biasanya pelarut yang tidak mengandung sistem terkonjugasi merupakan pelarut pilihan.

Tabel II.4 Macam pelarut dan panjang gelombang minimal pelarut tidak menyerap sinar UV
(Gandjar dan Rohman, 2012)

Pelarut	UV <i>cut-off</i> (nm)
n-heksan	195
Sikloheksan	200
Tetraklorometan	265
Metilbenzen	285
Triklorometan	245
Diklorometan	230
Tetrahidrofuran	212
Propanon	330
Asetonitril	190
Iso-propanol	205
Etanol	205
Metanol	205
Asam etanoat	255
Air	190
1,4-dioksan	215
Isooktana	195
Trimetilfosfat	210

b. Pengaruh pada struktur halus dan tajam (*fine structure*) pada pita serapan. Pelarut non polar tidak berikatan hidrogen dengan senyawa yang terlarut, dengan demikian spektrum senyawa mendekati spektrum senyawa dalam keadaan gasnya, yang mana struktur halus dan tajam yang teramati. Dalam pelarut polar, ikatan hidrogen membentuk kompleks dengan senyawa pelarut, dan struktur halus dan tajam tidak muncul.

c. Kemampuan mempengaruhi panjang gelombang dari sinar UV yang diabsorpsi dalam keadaan dasar dan tereksitasi. Pelarut polar dalam keadaan tereksitasi tidak membentuk ikatan hidrogen semudah dalam keadaan dasar, sehingga meningkatkan energi transisi elektronik molekul. Pelarut polar menggeser transisi dari $n \rightarrow \pi^*$ sehingga panjang gelombang menjadi lebih pendek. Namun dalam kasus tertentu, keadaan tereksitasi dapat membentuk ikatan hidrogen lebih kuat dari keadaan dasar. Dalam kasus seperti itu, pelarut polar menggeser panjang gelombang menjadi lebih panjang karena energi dari transisi elektronik menurun. Pelarut polar menggeser transisi dari $\pi \rightarrow \pi^*$ sehingga panjang gelombang menjadi lebih panjang (Gandjar dan Rohman, 2012; Pavia *et al.*, 2009).

3) Pengaturan suhu

Suhu rendah menawarkan pita serapan senyawa obat yang lebih tajam daripada suhu kamar. Resolusi vibrasional akan lebih baik karena level vibrasional yang ditempati lebih sedikit dan tingkat interaksi solut-pelarut diminimalkan (Gandjar dan Rohman, 2012).

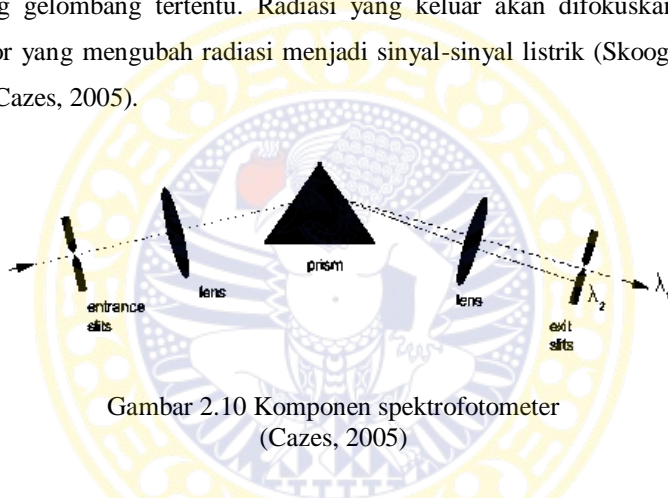
4) Ion-ion organik

Sifat kromoforik yang terdapat dalam senyawa anorganik ada 2, yaitu melibatkan beberapa atom seperti MnO_4^- dan $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ dan yang

melibatkan atom tunggal yang memiliki kulit elektron terluar d- yang tidak lengkap (Gandjar dan Rohman, 2012).

2.4.2 Instrumen spektrofotometer UV-Vis

Ada empat bagian utama dari instrumen spektrofotometer, yaitu sumber sinar, monokromator, kuvet dan detektor. Cahaya putih dari sumber sinar akan dilewatkan melalui monokromator sehingga sinar mempunyai panjang gelombang tertentu. Radiasi yang keluar akan difokuskan pada detektor yang mengubah radiasi menjadi sinyal-sinyal listrik (Skoog *et al.*, 2007; Cazes, 2005).



Gambar 2.10 Komponen spektrofotometer
(Cazes, 2005)

2.4.2.1 Sumber radiasi

Sumber radiasi atau lampu pada kenyataannya merupakan dua lampu yang terpisah yang secara bersama-sama mampu menjangkau keseluruhan daerah spektrum ultraviolet dan sinar tampak. Persyaratan sumber yang digunakan dalam spektrofotometri adalah intensitas emisi yang cukup tinggi di wilayah spektral tertentu, stabilitas jangka pendek dan distribusi spasial dari emisi yang seragam (Skoog *et al.*, 2007).

Macam-macam sumber radiasi:

1. Lampu deuterium, dipakai pada daerah panjang gelombang 190 nm sampai 380 nm (daerah dekat ultra violet dekat), karena pada rentangan panjang gelombang tersebut sumber radiasi deuterium memberikan spektrum energi radiasi yang lurus. Umur sumber radiasi deuterium sekitar 500 jam pemakaian (Mulja dan Suharman, 1995; Gandjar dan Rohman, 2012).

2. Lampu tungsten, merupakan campuran dari filamen tungsten dan gas iodin (halogen), oleh sebab itu disebut sebagai sumber radiasi “tungsten-iodine”. Dipakai pada daerah pengukuran 350-2000 nm, karena pada daerah tersebut sumber radiasi “tungsten-iodine” memberikan energi radiasi sebagai garis lengkung sehingga cocok untuk kolorimetri. Umur pemakaian sekitar 1000 jam pemakaian (Mulja dan Suharman, 1995; Gandjar dan Rohman, 2012).

3. Lampu xenon, dipakai pada daerah 200 sampai 1000 nm. Lampu xenon akan mempunyai kepekaan yang optimum pada 500 nm (Skoog *et al.*, 2007).

2.4.2.2 Monokromator

Monokromator berfungsi untuk mendapatkan radiasi monokromatis dari sumber radiasi yang memancarkan radiasi polikromatis. Monokromator terdiri dari:

1. Filter optik, berfungsi untuk menyerap warna komplementer sehingga cahaya tampak yang diteruskan merupakan cahaya yang berwarna sesuai warna filter optik yang digunakan. Filter optik yang baik adalah berdasar interferensi cahaya-cahaya yang saling menguatkan (interferensi

konstruktif) atau interferensi cahaya-cahaya yang saling meniadakan (interferensi destruktif) (Mulja dan Suharman, 1995).

2. Prisma, merupakan suatu lempeng kuarsa yang membiaskan sinar yang melaluinya. Banyaknya pembiasan tergantung dengan panjang gelombang sinar, dengan demikian sinar putih dapat terpecah ke dalam warna penyusunnya (Gandjar dan Rohman, 2012).

3. Kisi difraksi, merupakan kepingan kecil gelas bercermin yang didalamnya terdapat sejumlah garis yang berarak sama yang terpotong-potong, beberapa ribu per milimeter kisi, untuk memberikan struktur yang nampak seperti sisir kecil (Gandjar dan Rohman, 2012).

2.4.2.3 Kuvet

Kuvet merupakan wadah sampel yang akan dianalisis. Ditinjau dari bahan yang dipakai, kuvet ada dua macam yaitu: kuvet leburan silika dan kuvet dari gelas. Kuvet leburan silika dapat dipakai pada daerah pengukuran 190-1100 nm. Kuvet dari gelas dipakai pada daerah pengukuran 380-1100 nm karena bahan dari gelas mengabsorpsi radiasi UV (Mulja dan Suharman, 1995).

2.4.2.4 Detektor

Fungsi detektor adalah mengubah sinyal radiasi yang diterima menjadi sinyal elektronik. Beberapa macam detektor: detektor Fotosel, detektor Tabung Foton Hampa, detektor Tabung Penggandaan Foton dan detektor PDA (*Photo Diode-Array*) (Mulja dan Suharman, 1995).

Detektor PDA (*Photo Diode-Array*) memiliki jumlah elemen dari 128 – 1024 buah, dan PDA yang lebih baru telah dibuat dengan dioda berdekatan 25,6 mm dan spasi 25 mm pada pusatnya sehingga detektor

tersebut mampu mendeteksi dan mengukur serapan tidak hanya pada panjang gelombang maksimum tetapi juga pada berbagai panjang gelombang dengan akurasi yang kurang lebih sama. *Photodiode* mengkonversi cahaya menjadi sinyal elektrik dalam waktu berkisar 0,1 detik dan kemudian menyimpannya (Choi, 2015).Keunggulan detektor ini dibandingkan detektor lain adalah sumber radiasi tunggal, radiasi yang diukur adalah radiasi polikromatis, *wave length reproducibility* karena tidak ada gerakan mekanis untuk mengatur panjang gelombang, dan kecepatan *scanning* sangat tinggi (Agilent technologies, 2014).

2.4.3 Hukum Lambert – Beer

Hukum *Lambert - Beer* menyatakan bahwa jumlah radiasi cahaya tampak, ultra-violet dan cahaya-cahaya lain yang diserap atau ditransmisikan oleh suatu larutan merupakan suatu fungsi eksponen dari konsentrasi zat dan tebal larutan. Hukum ini secara sederhana dapat dinyatakan dalam rumus berikut (Skoog *et al.*, 2007):

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I_t}$$

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Keterangan:

- A : absorban/ serapan
 T : transmittan
 I₀ : intensitas radiasi yang datang
 I_t : intensitas radiasi yang diteruskan
 ε : absorbansi molar (M cm⁻¹)
 b : tebal kuvet (cm)
 c : konsentrasi (M)

Hukum *Lambert – Beer* juga berlaku untuk campuran beberapa zat yang menunjukkan tidak ada interaksi (Skoog *et al.*, 2007):

$$A_{\text{total}} = A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n$$

2.4.4 Analisis kuantitatif zat tunggal tanpa gangguan latar belakang

Analisis kuantitatif zat tunggal dilakukan pengukuran harga serapan (A) pada panjang gelombang maksimum atau dilakukan pengukuran %T pada panjang gelombang minimum (Skoog *et al.*, 2007).

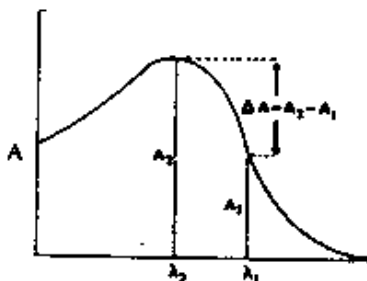
Analisis kuantitatif zat tunggal dilakukan dengan 4 cara pelaksanaan yaitu membandingkan serapan zat yang dianalisis dengan *reference standard*, memakai kurva baku dari larutan *reference standard*, menghitung harga serapan larutan sampel $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ dan memakai perhitungan nilai ekstingsi molar (ϵ) (Skoog *et al.*, 2007).

2.4.5 Analisis kuantitatif zat tunggal dengan gangguan latar belakang

2.4.5.1 Derivatif

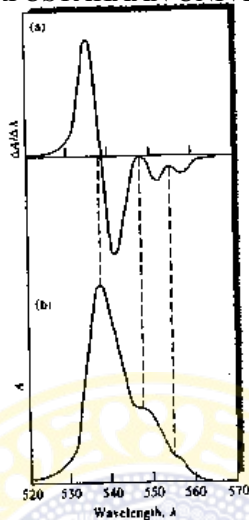
Kegunaan spektrofotometri UV-Vis cara derivatif adalah dipakai untuk campuran zat kimia yang terdiri dari :

- Campuran dua zat kimia yang spektrumnya *overlapping* atau sangat mirip
- Campuran dua zat kimia yang merupakan isomer
- Campuran dua zat kimia yang keruh



Gambar 2.11 Mencari beda serapan (ΔA) dua panjang gelombang (Mulja dan Suharman, 1995)

Beberapa keuntungan dari spektrum derivatif antara lain: spektrum derivatif memberikan gambaran struktur yang terinci dari spektrum serapan dan gambaran ini makin jelas dari spektra derivatif pertama ke derivatif keempat. Selain itu, dapat dilakukan analisis kuantitatif suatu komponen dalam campuran dengan bahan yang panjang gelombangnya saling berdekatan. Kekurangan utama teknik derivatif adalah *signal-to-noise ratio* (S/N ratio) yang makin meningkat dengan meningkatnya orde (Mulja dan Suharman, 1995; Skoog *et al.*, 2007).



Gambar 2.12 Perbedaan spektra derivatif (a) dengan spektra serapan standar (b)
(Skoog *et al.*, 2007)

Kurva derivatif pertama didapatkan dengan cara menggambarkan kurva selisih serapan pada dua panjang gelombang ($\Delta A = A\lambda_1 - A\lambda_2$) terhadap harga rata-rata dua panjang gelombang tersebut

$$\lambda_m = \frac{\lambda_1 + \lambda_2}{2}$$

Kurva derivatif yang didapat dipakai untuk mencari harga λ_m dimana ΔA untuk zat tertentu = 0, sehingga zat yang lain dapat ditetapkan kadarnya tanpa gangguan (Mulja dan Suharman, 1995).

2.4.5.2 Tiga panjang gelombang

Cara ini dapat dipakai untuk analisa kuantitatif campuran multikomponen zat kimia dengan pengamatan pada daerah tiga panjang gelombang. Pengamatan tiga panjang gelombang sesuai untuk menentukan komponen zat kimia yang spektranya terganggu secara keseluruhan dengan

komponen lain atau dalam larutan keruh. Secara umum rumus dari metode ini adalah :

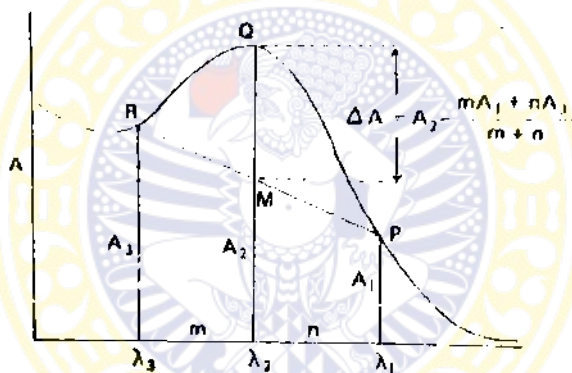
$$F = K_1 A_1 + K_2 A_2 + K_3 A_3$$

dimana F setara dengan konsentrasi

A1,A2,A3 : absorpsi pada tiap panjang gelombang

K1,K2,K3 : faktor

Gambar dibawah ini merupakan perhitungan secara matematik untuk mendapatkan harga K1, K2, K3:



Gambar 2.13 Mencari beda serapan (ΔA) tiga panjang gelombang (Mulja dan Suharman, 1995)

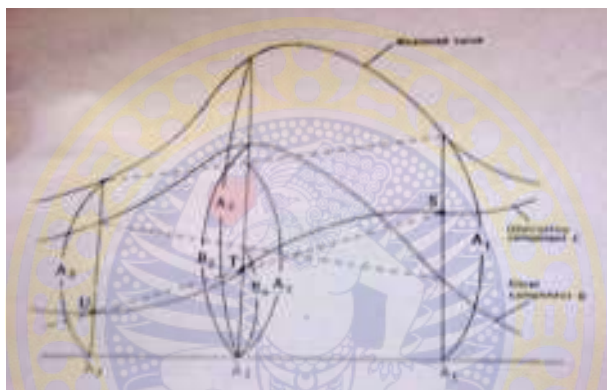
Sehingga dapat dikatakan bahwa:

$$\Delta A = \left(-\frac{m}{m+n}\right) A_1 + A_2 + \left(-\frac{n}{n+m}\right) A_3$$

Dengan demikian, $K_1 = \left(-\frac{m}{m+n}\right)$; $K_2 = 1$; $K_3 = \left(-\frac{n}{n+m}\right)$

Selanjutnya dapat dikatakan bahwa harga F dan ΔA sebagai ordinat konsentrasi zat yang diamati sebagai absis akan didapatkan suatu grafik kurva baku yang linier.

Aplikasi pengamatan tiga panjang gelombang untuk analisis kuantitatif zat B yang terganggu dengan adanya zat C (*Obstructive component*) yang berada dalam campuran dapat dilihat pada gambar berikut ini :



Gambar 2.14 Prinsip pengamatan tiga panjang gelombang (Mulja dan Suharman, 1995)

Dari gambar tersebut akan didapatkan ΔB untuk zat B kadar tertentu yang terampu dengan zat C sebagai:

$$\Delta A = A_2 - \frac{(\lambda_1 - \lambda_2) A_3 + (\lambda_2 - \lambda_3) A_1}{(\lambda_1 - \lambda_2) + (\lambda_2 - \lambda_3)}$$

2.5 Validasi metode

Validasi suatu prosedur analisis adalah proses yang ditetapkan melalui kajian laboratorium bahwa karakteristik kinerja prosedur tersebut telah memenuhi persyaratan sesuai dengan tujuan penggunaannya. Jenis

karakteristik kinerja analitik yang digunakan dalam validasi metode adalah akurasi, presisi, spesifisitas, batas deteksi, batas kuantitasi, linearitas, rentang, ketegaran (Depkes RI, 2014).

Validasi metode analisis merupakan suatu tahapan penting dalam penjaminan mutu analisis kuantitatif, selain itu, validasi metode analisis ditunjukkan untuk menjamin bahwa metode analisis memenuhi spesifikasi yang dapat diterima sesuai dengan tujuan yang diharapkan (Gandjar dan Rohman, 2014). Menurut Gandjar dan Rohman, suatu metode analisis harus divalidasi untuk melakukan verifikasi bahwa parameter-parameter kinerjanya cukup mampu untuk mengatasi problem analisis, karena suatu metode harus divalidasi, ketika:

- 1) Metode baru dikembangkan untuk mengatasi masalah analisis tertentu.
- 2) Metode yang sudah baku direvisi untuk menyesuaikan perkembangan atau karena munculnya suatu problem yang mengarahkan bahwa metode baku tersebut harus direvisi.
- 3) Penjaminan mutu yang mengindikasikan bahwa metode baku telah berubah seiring dengan berjalannya waktu.
- 4) Metode baku digunakan di laboratorium yang berbeda, dikerjakan oleh analisis yang berbeda, atau dikerjakan dengan alat yang berbeda.
- 5) Untuk mendemonstrasikan kesetaraan antar 2 metode, seperti antara metode baru dan metode baku.

Persyaratan pengujian farmakope beragam, mulai dari penetapan analisis tingkat kepastian tinggi sampai evaluasi terhadap karakteristik. Setiap prosedur analisis yang berbeda memerlukan skema validasi yang

berbeda. Kategori pengujian umum yang mensyaratkan data validasi sebagai berikut (Depkes RI, 2014):

a) Kategori I, prosedur analisis untuk penetapan kadar komponen utama dalam bahan baku obat atau bahan aktif (termasuk pengawet) dalam sediaan obat jadi.

b) Kategori II, prosedur analisis untuk penetapan cemaran dalam bahan baku obat atau senyawa hasil degradasi dalam sediaan obat jadi. Prosedur ini terdiri dari penetapan kuantitatif dan uji batas.

c) Kategori III, prosedur analisis untuk penetapan karakteristik kinerja sediaan (misalnya disolusi, pelepasan obat).

d) Kategori IV, prosedur analisis untuk identifikasi

Tabel II.5 Parameter yang dilakukan untuk validasi
(Depkes RI, 2014)

Karakteristik kinerja analitik	Kategori I	Kategori II		Kategori III	Kategori IV
		Kuantitatif	Uji batas		
Akurasi	Ya	Ya	*	*	Tidak
Presisi	Ya	Ya	Tidak	Ya	Tidak
Spesifisitas	Ya	Ya	Ya	*	Ya
Batas deteksi	Tidak	Tidak	Ya	*	Tidak
Batas kuantitasi	Tidak	Ya	Tidak	*	Tidak
Linieritas	Ya	Ya	Tidak	*	Tidak
Rentang	Ya	Ya	*	*	Tidak

*Mungkin dipersyaratkan tergantung pada sifat khusus dari uji

2.5.1 Spesifisitas

Spesifisitas adalah kemampuan untuk menguji secara tepat suatu analit dengan adanya komponen lain dan diperkirakan ada sebagai cemaran, hasil degradasi, dan matriks sampel. Ketidadaan spesifisitas dari prosedur dapat diatasi dengan penggunaan prosedur analitik pendukung.

Adapun pengujian yang dilakukan untuk penetapan spesifisitas ini adalah sebagai berikut:

1. Identifikasi

Metode harus mampu menyeleksi senyawa-senyawa yang ada dalam sampel yang berkaitan dengan struktur molekulnya. Dapat dibuktikan dengan hasil positif atau dibandingkan dengan bahan acuan standar yang diketahui dari sampel yang mengandung analit dan digabungkan dengan hasil negatif dari sampel yang tidak mengandung analit.

2. Penetapan cemaran

Dilakukan dengan menguji sampel yang ditambahkan sejumlah tertentu cemaran atau hasil urai dan terlihat dengan nyata cemaran itu dapat ditetapkan secara akurat dan presisi yang memadai.

3. Penetapan kadar

Dinyatakan jelas bahwa prosedur tidak dipengaruhi oleh adanya cemaran atau matriks. Dalam praktek dapat dilakukan dengan cara menguji sampel yang ditambahkan sejumlah tertentu cemaran atau matrik dan terlihat nyata bahwa prosedur tidak dipengaruhi oleh komponen asing tersebut (Depkes RI, 2014).

2.5.2 Linieritas

Linieritas adalah kemampuan untuk menunjukkan hasil uji yang secara langsung atau dengan melalui transformasi matematik yang tepat

proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel dalam rentang yang diberikan. Linieritas mengacu pada hubungan linier antara konsentrasi dan hasil pengukuran pengujian (Depkes RI, 2014).

Linieritas ditetapkan menggunakan minimal 5 konsentrasi yang digunakan secara normal (ICH, 2005). Larutan baku kerja didapat dari pengenceran baku induk untuk menghindari kesalahan acak yang mungkin terjadi bila dilakukan penimbangan individual untuk larutan baku kerja (AOAC, 2002). Penetapan linieritas dapat ditentukan sepanjang rentang prosedur analisis. Linieritas digambarkan secara visual antara “signal” sebagai fungsi dari konsentrasi analit.

Jika terlihat ada hubungan yang linier, hasil uji dapat ditentukan dengan metode statistik (misalnya dengan perhitungan garis regresi kuadrat terkecil). Data dari garis regresi dapat menunjukkan perkiraan derajat linieritas, seperti koefisien korelasi, perpotongan sumbu y, arah garis regresi dan jumlah kuadrat residu garis regresi yang dapat diterima (Gandjar dan Rohman, 2012).

Apabila koefisien korelasi lebih kecil dari 0,999 maka dilakukan perhitungan koefisien variasi fungsi regresi (V_{x_0}). Selain koefisien korelasi dan V_{x_0} , parameter linieritas yang lain adalah X_p . Perhitungan V_{x_0} dan X_p sebagai berikut:

$$V_{x_0} = \frac{S_{x_0}}{\bar{X}} \times 100\%$$

$$S_{x_0} = \frac{S_y}{b} ; S_y = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{N-2}}$$

$$X_p = 2S_{x_0} t_{table} \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{(Y_p - \bar{y})^2}{b^2 Q_{XX}}}$$

$$Y_p = a + S_y t_{table} \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{\bar{x}^2}{Q_{XX}}} ; Q_{XX} = \sum X_i^2 - \frac{1}{N} \left(\sum X_i \right)^2$$

Dengan:

- S_y : simpangan baku residual
 y_i : semua titik pada garis regresi yang berpadanan dengan x_i
 \hat{y}_i : hasil perhitungan dari persamaan $y = bx + a$
 \bar{x} : rata-rata dari x
 N : banyaknya konsentrasi
 a : *intercept*
 b : *slope*

Nilai V_{x_0} yang semakin kecil menandakan kelinieran yang cukup. V_{x_0} untuk analisis bahan aktif dalam sediaan adalah $\leq 5\%$. Konsentrasi terendah yang digunakan dalam linieritas tidak boleh lebih rendah dari nilai X_p (Yuwono dan Indriyanto, 2005).

2.5.3 Akurasi

Akurasi adalah tingkat kedekatan antara hasil pengujian dengan prosedur yang sedang divalidasi terhadap nilai yang benar. Penetapan akurasi pada pengujian senyawa, ditetapkan pada analit yang diketahui

kemurniannya, atau dengan senyawa lain yang telah ditetapkan akurasi (Depkes RI, 2014).

Dokumen ICH merekomendasikan bahwa akurasi ditetapkan dengan menggunakan minimal 9 penetapan meliputi 3 tingkat konsentrasi berbeda yang telah ditetapkan (misalnya 3 konsentrasi dan 3 replikasi untuk masing-masing konsentrasi).

Akurasi dihitung sebagai presentase perolehan kembali dari penetapan sejumlah standar analit yang ditambahkan pada plasebo atau penambahan standar analit pada sampel (AOAC, 2002).

Harga persen perolehan kembali dapat dihitung melalui rumus :

$$R = \frac{C_{sp}}{C_s} \times 100\%$$

Keterangan :

- R = persen perolehan kembali
 C_{sp} = kadar yang didapatkan kembali
 C_s = kadar sesungguhnya

Tabel II.6 Kriteria penerimaan akurasi dan presisi
(Yuwono dan Indrayanto, 2005).

Analitik pada matriks sampel (%)	% Perolehan kembali	Keterulangan RSD (%)
100	98-102	1,3
>10	98-102	2,7
>1	97-103	2,8
>0,1	95-105	3,7
0,01	90-107	5,3
0,001	90-107	7,3
0,0001 (1 ppm)	80-110	11
0,00001 (100 ppb)	80-110	15
0,000001 (10 ppb)	60-115	21
0,0000001 (1 ppb)	40-120	30

2.5.4 Presisi

Presisi prosedur analisis adalah tingkat kedekatan diantara hasil uji individu bila prosedur diterapkan berulang kali terhadap sampling ganda atau sampel yang homogen. Presisi biasanya dinyatakan sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi) dari satu seri pengukuran. Presisi merupakan ukuran tingkat *reproducibility* atau *repeatability* prosedur analisis dalam kondisi kerja normal. *Intermediate precision*, menyatakan keragaman dalam laboratorium yang dilakukan pada hari yang berbeda atau oleh analis yang berbeda atau peralatan yang berbeda di laboratorium yang sama (Depkes RI, 2014).

Tabel II. 7Macam-macam presisi dan perbedaan
(ICH, 2005)

Presisi	Analisis pada		
	Hari	Analisis	Laboratorium
<i>Repeatability</i>	sama	sama	sama
<i>Intermediate precision</i>	beda	beda	Sama
<i>Reproducibility</i>	beda	beda	beda

Repeatability ditentukan dengan menggunakan minimal 9 penetapan meliputi suatu rentang konsentrasi khusus untuk prosedur (misalnya 3 konsentrasi dan 3 replikasi untuk masing-masing konsentrasi, atau minimal 6 penetapan pada konsentrasi uji 100%) (ICH, 2005).

Presisi dari metode uji ditentukan dengan rumus :

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-2}}$$

$$KV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

Keterangan

SD : Standar Deviasi

\bar{x} : Nilai Rata-rata

N : jumlah sampel

KV : Koefisien Variasi

Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan koefisien variasi $\leq 2\%$. Kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang dianalisis, jumlah sampel dan kondisi laboratorium. Nilai RSD

atau koefisien variasi meningkat dengan menurunnya kadar analit yang dianalisis (Harmita, 2004). Kriteria penerimaan untuk nilai RSD pada studi presisi dari pengujian produk akhir dan keseragaman isi dapat dilihat pada tabel II.6.

2.5.5 Rentang (*Range*)

Rentang adalah interval antara batas tertinggi dan batas terendah dari kadar analit yang telah dibuktikan, dapat ditentukan dengan presisi, akurasi, dan linearitas yang sesuai menggunakan prosedur analisis yang ditetapkan (Depkes RI, 2014). Rentang spesifikasi minimum yang digunakan, untuk penetapan kadar senyawa obat atau sediaan farmasi akhir 80% sampai 120 % dari konsentrasi uji. Untuk keseragaman kandungan minimal 70 % sampai 130% dari konsentrasi uji. Uji untuk disolusi ± 20 % dari rentang spesifik misalnya pada sediaan lepas terkendali, setelah 1 jam 20 % dan setelah 24 jam 90%, jadi rentang validasi dari 0% - 110% dari konsentrasi yang dinyatakan dalam etiket (ICH, 2005).

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Uraian kerangka konseptual

Prevalensi fraktur akibat osteoporosis pada penggunaan kortikosteroid jangka panjang sekitar 17% (Setyorini *et al.*, 2009). Osteoporosis terjadi karena kortikosteroid menghambat aktivitas osteoblas dan menginduksi apoptosis osteoblas serta osteosit. Osteoporosis terutama terjadi pada pasien yang menerima kortikosteroid dengan dosis yang setara dengan prednison > 5 mg/hari (Sitompul, 2011).

Untuk menjamin tercapainya efek terapi dan keamanan dari produk obat maka perlu dilakukan penetapan kadar prednison sebagai kontrol kualitas. Seperti yang tertera pada FI V, persyaratan kadar prednison dalam tablet tidak kurang dari 90% dan tidak lebih dari 110% dari jumlah yang tertera di etiket. Metode penetapan kadar prednison dalam tablet menurut FI V menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) (Depkes RI, 2014).

Metode analisis menggunakan KCKT memiliki ketelitian dan ketepatan yang tinggi, namun memerlukan biaya besar dan waktu yang lama, sehingga kurang sesuai untuk kontrol kualitas produk obat secara rutin (Skoog *et al.*, 2007; Khosayand *et al.*, 2010). Oleh karena itu perlu dicari metode alternatif yang membutuhkan waktu analisis lebih singkat dengan biaya yang lebih rendah namun tetap memberikan ketepatan yang cukup tinggi. Metode alternatif tersebut adalah metode spektrofotometri UV-Vis (Skoog *et al.*, 2007; Amalia *et al.*, 2011; Djalil *et al.*, 2014).

Syarat senyawa yang dapat dianalisis menggunakan spektrofotometri UV-Vis adalah senyawa yang mengandung gugus kromofor dan

auksokrom. Gugus kromofor merupakan gugus atau atom dalam senyawa organik yang dapat memberikan serapan pada daerah ultra-violet dan sinar tampak. Gugus auksokrom merupakan gugus fungsional yang mempunyai elektron bebas (Skoog *et al.*, 2007; Gandjar dan Rohman, 2012). Dilihat dari strukturnya, prednison memiliki ikatan rangkap terkonjugasi dan gugus karbonil sebagai gugus kromofor, gugus OH sebagai gugus auksokrom sehingga dapat dianalisis menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis.

Tablet prednison dalam formulasi juga mengandung zat pewarna. Zat pewarna yang digunakan dalam penelitian ini adalah campuran *light green* dan tartrazin sehingga menghasilkan warna hijau muda. Zat pewarna ternyata juga memiliki gugus kromofor dan auksokrom yang dapat memberikan serapan pada daerah UV-Vis sehingga apabila dilakukan analisis kadar tablet prednison menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum prednison, maka serapan dari zat pewarna akan mempengaruhi hasil pengukuran.

Untuk mengatasi permasalahan ini, maka digunakan analisis kuantitatif dengan cara pengamatan tiga panjang gelombang. Keuntungan analisis kuantitatif teknik tiga panjang gelombang adalah dapat digunakan untuk analisis zat yang terganggu dengan adanya zat lain dalam campuran sehingga dapat mengurangi kesalahan pengamatan, analisis lebih cepat dan lebih mudah (Mulja dan Suharman, 1995; Singh dan Verma, 2008).

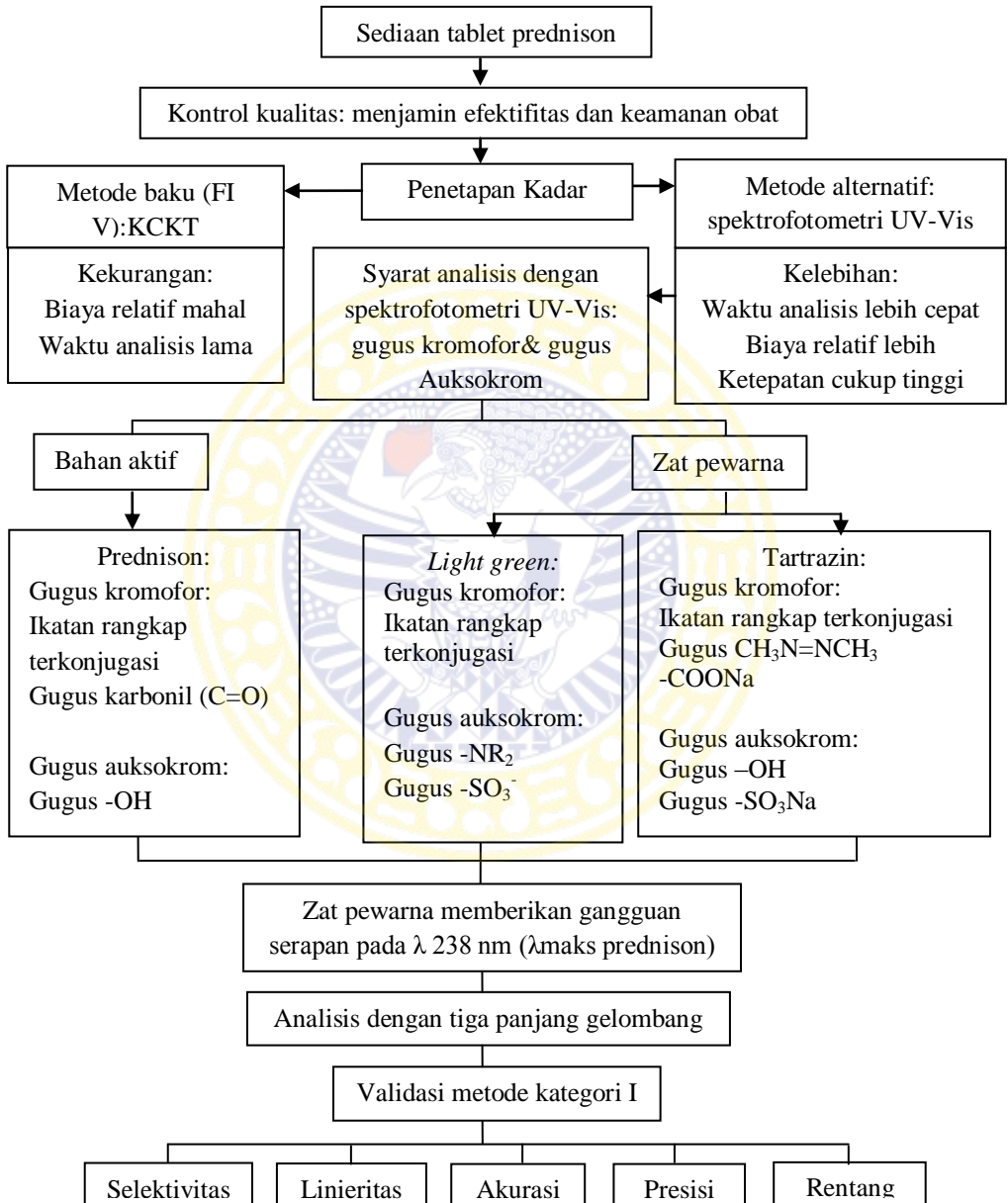
Metode penetapan kadar prednison dalam tablet yang mengandung zat pewarna menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan pengamatan tiga panjang gelombang perlu divalidasi terlebih dahulu sebelum digunakan untuk analisis rutin. Validasi harus dilakukan berguna untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reproduisible pada kisaran analit

yang dianalisis (Riyanto, 2014; Ganjar dan Rohman 2007; Depkes RI, 2014).

Berdasarkan Departemen Kesehatan RI (2014) penetapan kadar prednison dalam sediaan tablet termasuk dalam validasi metode kategori satu. Sehingga parameter validasi yang perlu ditentukan adalah akurasi, presisi, spesifisitas, linieritas dan rentang (Depkes RI, 2014).



3.2 Skema kerangka konseptual



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Alat dan bahan penelitian

4.1.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

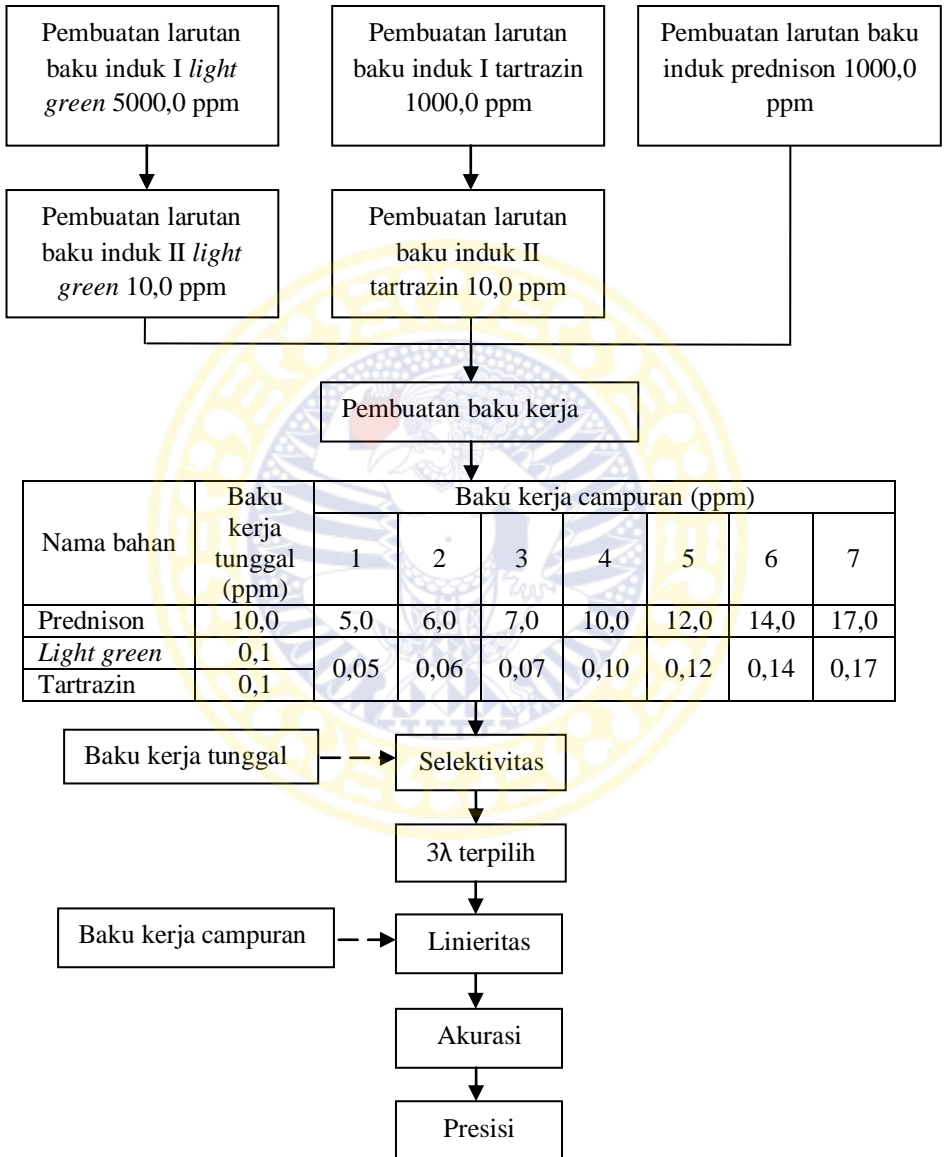
- a. Prednison p.a (*Tianjin Tianyao Pharmaceutical Co., Ltd.*)
- b. *Light green* p.a (*PT. Roha Lautan Pewarna*)
- c. Tartrazin p.a (*PT. Roha Lautan Pewarna*)
- d. Plasebo (*PT. Novapharin Pharmaceutical Industries*)
- e. Metanol p.a (*Merck*)

4.1.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Spektrofotometer UV – Vis Hitachi UH-5300
- b. Neraca analitik
- c. Mikropipet *Socorex*
- d. Ultrasonik Branson 3510
- e. Kuvet
- f. Mortir dan stamper
- g. Alat-alat gelas

4.2 Kerangka operasional



4.3 Prosedur penelitian

4.3.1 Pembuatan larutan baku induk *light green*

Dibuat larutan baku induk *light green*, yaitu dengan ditimbang teliti 50,0 mg *lightgreen*, kemudian dilarutkan dengan metanol, setelah itu dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL. Ditambah metanol hingga tepat tanda sehingga didapatkan larutan baku induk I *light green* 5000,0 ppm. Dipipet 20,0 μ L larutan baku induk I *light green* 5000,0 ppm, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL dan ditambah metanol hingga tepat tanda sehingga didapatkan larutan baku induk II *light green* 10,0 ppm.

4.3.2 Pembuatan larutan baku induk tartrazin

Dibuat larutan baku induk tartrazin, yaitu dengan ditimbang teliti 50,0 mg tartrazin, kemudian dilarutkan dengan metanol, setelah itu dimasukkan ke dalam labu ukur 50,0 mL. Ditambah metanol hingga tepat tanda sehingga didapatkan larutan baku induk I tartrazin 1000,0 ppm. Dipipet 100,0 μ L larutan baku induk I tartrazin 1000,0 ppm, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL dan ditambah metanol hingga tepat tanda sehingga didapatkan larutan baku induk II tartrazin 10,0 ppm.

4.3.3 Pembuatan larutan baku induk prednison

Dibuat larutan baku induk prednison, yaitu dengan ditimbang teliti 50,0 mg prednison dan dilarutkan dengan metanol. Kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50,0 mL dan ditambah metanol hingga tepat tanda sehingga didapatkan larutan baku induk prednison 1000,0 ppm.

4.3.4 Pembuatan larutan baku kerja tunggal untuk selektivitas

Dibuat larutan baku kerja tunggal prednison, *light green*, dan tartrazin. Untuk membuat larutan baku kerja tersebut adalah sebagai berikut:

a. Larutan baku induk prednison 1000,0 ppm dipipet 250,0 μL , dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL kemudian ditambah metanol hingga tepat tanda dan dikocok sampai homogen, sehingga didapatkan larutan baku kerja prednison 10,0 ppm.

b. Larutan baku induk II *light green* 10,0 ppm dipipet 250,0 μL , dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL kemudian ditambah metanol hingga tepat tanda dan dikocok sampai homogen, sehingga didapatkan larutan baku kerja *light green* 0,1 ppm.

c. Larutan baku induk II tartrazin 10,0 ppm dipipet 250,0 μL , dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL kemudian ditambah metanol hingga tepat tanda dan dikocok sampai homogen, sehingga didapatkan larutan baku kerja tartrazin 0,1 ppm.

4.3.5 Pembuatan larutan baku kerja campuran untuk linieritas

Dibuat larutan baku kerja campuran antara prednison, *light green*, dan tartrazin. Untuk membuat larutan baku kerja tersebut adalah sebagai berikut :

a. Dipipet 125,0 μL larutan baku induk prednison 1000,0 ppm, dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL kemudian ditambah larutan baku induk II *light green* 10,0 ppm dan larutan baku induk II tartrazin 10,0 ppm masing-masing 125,0 μL . Ditambah metanol hingga tepat tanda dan dikocok sampai homogen, sehingga didapatkan larutan baku kerja

prednison 5,0 ppm mengandung *light green* 0,05 ppm dan tartrazin 0,05 ppm.

b. Dipipet 150,0 μL larutan baku induk prednison 1000,0 ppm, dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL kemudian ditambah larutan baku induk II *light green* 10,0 ppm dan larutan baku induk II tartrazin 10,0 ppm masing-masing 150,0 μL . Ditambah metanol hingga tepat tanda dan dikocok sampai homogen, sehingga didapatkan larutan baku kerja prednison 6,0 ppm mengandung *light green* 0,06 ppm dan tartrazin 0,06 ppm.

c. Dipipet 175,0 μL larutan baku induk prednison 1000,0 ppm, dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL kemudian ditambah larutan baku induk II *light green* 10,0 ppm dan larutan baku induk II tartrazin 10,0 ppm masing-masing 175,0 μL . Ditambah metanol hingga tepat tanda dan dikocok sampai homogen, sehingga didapatkan larutan baku kerja prednison 7,0 ppm mengandung *light green* 0,07 ppm dan tartrazin 0,07 ppm.

d. Dipipet 250,0 μL larutan baku induk prednison 1000,0 ppm, dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL kemudian ditambah larutan baku induk II *light green* 10,0 ppm dan larutan baku induk II tartrazin 10,0 ppm masing-masing 250,0 μL . Ditambah metanol hingga tepat tanda dan dikocok sampai homogen, sehingga didapatkan larutan baku kerja prednison 10,0 ppm mengandung *light green* 0,1 ppm dan tartrazin 0,1 ppm.

e. Dipipet 300,0 μL larutan baku induk prednison 1000,0 ppm, dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL kemudian ditambah larutan baku induk II *light green* 10,0 ppm dan larutan baku induk II tartrazin 10,0 ppm masing-masing 300,0 μL . Ditambah metanol hingga tepat tanda dan dikocok sampai homogen, sehingga didapatkan larutan baku kerja

prednison 12,0 ppm mengandung *light green* 0,12 ppm dan tartrazin 0,12 ppm.

f. Dipipet 350,0 μL larutan baku induk prednison 1000,0 ppm, dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL kemudian ditambah larutan baku induk II *light green* 10,0 ppm dan larutan baku induk II tartrazin 10,0 ppm masing-masing 350,0 μL . Ditambah metanol hingga tepat tanda dan dikocok sampai homogen, sehingga didapatkan larutan baku kerja prednison 14,0 ppm mengandung *light green* 0,14 ppm dan tartrazin 0,14 ppm.

g. Dipipet 425,0 μL larutan baku induk prednison 1000,0 ppm, dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL kemudian ditambah larutan baku induk II *light green* 10,0 ppm dan larutan baku induk II tartrazin 10,0 ppm masing-masing 425,0 μL . Ditambah metanol hingga tepat tanda dan dikocok sampai homogen, sehingga didapatkan larutan baku kerja prednison 17,0 ppm mengandung *light green* 0,17 ppm dan tartrazin 0,17 ppm.

4.3.6 Keseragaman bobot

Ditimbang 20 tablet satu persatu, dihitung bobot rata-rata tiap tablet. Tidak boleh lebih dari 2 tablet yang masing-masing bobotnya menyimpang dari bobot rata-ratanya yang ditetapkan kolom A, dan tidak satu tablet pun yang bobotnya menyimpang dari bobot rata-ratanya yang ditetapkan di kolom B (Depkes RI, 1979).

Tabel IV.1 Penyimpangan bobot rata-rata tablet
(Depkes RI, 1979)

Bobot rata-rata	Penyimpangan bobot rata-rata dalam %	
	A	B
25 mg atau kurang	15%	30%
26 mg sampai 150 mg	10%	20%
151 mg sampai 300 mg	7,5%	15%
Lebih dari 300 mg	5%	10%

4.3.7 Pembuatan larutan sampel untuk akurasi dan presisi

Tabel IV.2 Komposisi prednison dan plasebo

Bahan	Komposisi		
	80%	100%	120%
Baku induk	0,8 mL	1,0 mL	1,2 mL
Prednison (5000,0 ppm)	(setara 4,0 mg prednison)	(setara 5,0 mg prednison)	(setara 6,0 mg prednison)
Plasebo	203,8 mg	202,8 mg	201,8 mg
Total*	207,8 mg	207,8 mg	207,8 mg

*Berat rata-rata tablet prednison berdasarkan hasil keseragaman bobot

Ditimbang teliti plasebo seperti yang tertera pada tabel IV.2 kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL. Ditambah prednison seperti yang tertera pada tabel IV.2 selanjutnya ditambah metanol \pm 5 mL dan kemudian diultrasonik selama 30 menit. Selanjutnya larutan tersebut ditambah metanol hingga tepat tanda. Kemudian larutan disaring menggunakan kertas saring *Whatmann* no 41. Masing-masing larutan

dipipet 0,5 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL, ditambah metanol sampai tepat tanda dan dikocok homogen sehingga diperoleh kadar 8,0 ppm; 10,0 ppm; dan 12,0 ppm.

4.4 Prosedur validasi

4.4.1 Selektivitas dan pemilihan panjang gelombang terpilih

Ditentukan 3λ terpilih prednison, *light green*, dan tartrazin. Larutan baku kerja tunggal yang telah dibuat pada butir 4.3.4 diamati pada lamda 200 – 400 nm dengan menggunakan blanko metanol. Dilakukan *overlay* profil spektra dari ketiga larutan tersebut, dipilih 3λ (maksimalperbedaan $\lambda=10$ nm) yang akan digunakan untuk analisis, dimana pada daerah tersebut komponen lain memberikan serapan yang relatif datar.

4.4.2 Linieritas

Larutan baku kerja campuran yang telah dibuat pada butir 4.3.5, diamati serapan pada 3λ terpilih. Dibuat kurva baku dari ΔA sebagai y dan konsentrasi sebagai x yang diamati dengan teknik tiga panjang gelombang sehingga diperoleh persamaan $y = bx + a$, dimana ΔA adalah sebagai berikut :

$$\Delta A = A_2 - \frac{(\lambda_1 - \lambda_2)A_3 + (\lambda_2 - \lambda_3)A_1}{(\lambda_1 - \lambda_2) + (\lambda_2 - \lambda_3)}$$

Kemudian dihitung harga koefisien korelasi (r). Dikatakan linier bila r hitung $\geq 0,999$. Jika nilai $r < 0,999$ maka digunakan persyaratan koefisien variasi fungsi regresi (V_{x_0}). V_{x_0} untuk analisis bahan aktif dalam sediaan

adalah $\leq 5\%$. Konsentrasi terendah yang digunakan dalam linieritas tidak boleh lebih rendah dari nilai X_p (Yuwono dan Indriyanto, 2005).

4.4.3 Akurasi

Akurasi dalam penelitian ini dilakukan dengan memasukkan analit (prednison) ke dalam plasebo. Larutan pada butir 4.3.7 yang mengandung prednison dalam berbagai komposisi (80%, 100% dan 120%) diamati serapan pada 3λ terpilih (dilakukan 3 kali replikasi tiap komposisi). ΔA yang didapatkan disubstitusikan kedalam persamaan regresi ΔA vs konsentrasi sehingga didapatkan x dan ditentukan % *recovery*. Dikatakan akurat bila % *recovery* adalah 97-103% (Yuwono dan Indrayanto, 2005).

4.4.4 Presisi

a. *Repeatability*

Dilakukan pengukuran larutan pada butir 4.3.7 yang mengandung prednison dalam komposisi 100% dengan replikasi sebanyak enam kali. Dikatakan presisi bila nilai KV (Koefisien Variasi) sebesar $\leq 2,8\%$ (Yuwono dan Indrayanto, 2005).

b. *Intermediate precision*

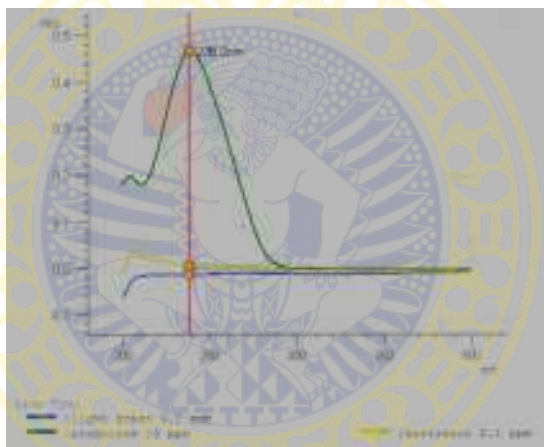
Pada hari yang berbeda, dilakukan pengukuran larutan pada butir 4.3.7 yang mengandung prednison dalam komposisi 100% dengan replikasi sebanyak enam kali. Untuk memastikan homogenitas variansi dilakukan uji Hartley. Dikatakan presisi bila nilai KV dari data *repeatability* (hari pertama) dan data *intermediate precision* (hari kedua) $\leq 3\%$ dan pada uji Hartley F_{\max} hitung $< F_{\max}$ tabel (Yuwono dan Indrayanto, 2005; Ott dan Longnecker, 2010).

BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Selektivitas dan pemilihan panjang gelombang terpilih

Larutan baku kerja tunggal prednison 10,0 ppm, *light green* 0,1 ppm dan tartrazin 0,1 ppm diamati serapan pada lamda 200 – 400 nm dengan menggunakan blanko metanol dan didapatkan profil spektra. Kemudian dilakukan *overlay* pada ketiga profil spektra tersebut dan diperoleh gambar 5.1



Gambar 5.1 Profil *overlay* spektra prednison 10,0 ppm, *light green* 0,1 ppm dan tartrazin 0,1 ppm

Prednison memiliki puncak serapan pada λ 238 nm. Hasil *overlay* profil spektra pada gambar dapat diketahui bahwa *light green* dan tartrazin juga mempunyai serapan pada λ 238 nm. Sehingga dipilih teknik tiga panjang gelombang untuk meminimalisir kesalahan pengamatan karena adanya serapan dari *light green* dan tartrazin.

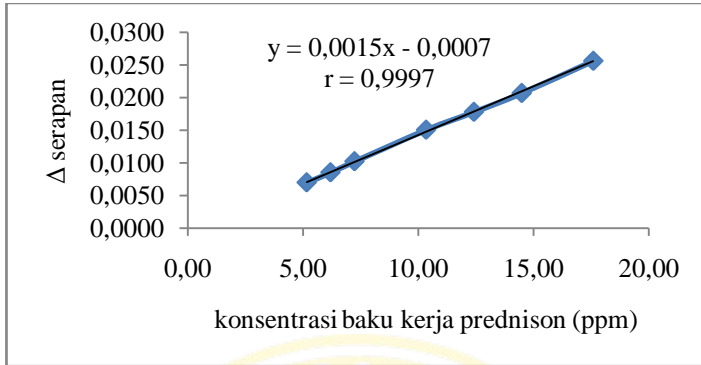
Didapatkan tiga panjang gelombang terpilih adalah 234 nm, 238 nm dan 242 nm karena pada daerah tersebut serapan *light green* dan tartrazin relatif datar dan tidak memunculkan puncak.

5.2 Linieritas

Larutan baku kerja campuran yang telah dibuat pada butir 4.3.5, diamati serapan pada 3 λ terpilih. Dibuat kurva baku dari ΔA sebagai y dan konsentrasi sebagai x yang dapat dilihat pada tabel V.1.

Tabel V.1 Data hubungan antara kadar prednison dengan Δ serapan

x konsentrasi(ppm)	y Δ serapan
5,17	0,0070
6,20	0,0085
7,24	0,0102
10,34	0,0151
12,41	0,0178
14,48	0,0207
17,58	0,0257
Persaman regresi	$y = 0,0015x - 0,0007$
Koefisien korelasi (r)	0,9997
V_{xo}	1,18%
X_p	0,81



Gambar 5.2 Kurva hubungan antara kadar prednison dengan Δ serapan

Berdasarkan hasil perhitungan diperoleh nilai koefisien korelasi (r) adalah 0,9997, nilai V_{x_0} adalah 1,18% dan nilai X_p adalah 0,81 ppm. Nilai r , V_{x_0} dan X_p tersebut memenuhi persyaratan linieritas karena $r \geq 0,999$, $V_{x_0} \leq 5\%$ dan X_p lebih rendah dari konsentrasi terkecil linieritas (Yuwono dan Indriyanto, 2005).

5.3 Akurasi

Akurasi dilakukan dengan memasukkan analit (prednison) ke dalam plasebo. Larutan pada butir 4.3.7 yang mengandung prednison dalam berbagai komposisi (80%, 100% dan 120%) diamati serapan pada 3λ terpilih (dilakukan 3 kali replikasi tiap komposisi). ΔA yang didapatkan disubstitusikan kedalam persamaan regresi ΔA vs konsentrasi sehingga didapatkan x dan ditentukan % *recovery*.

Tabel V.2 Data hasil % *recovery* prednison

Komposisi	Replikasi	Kadar yang ditambahkan (ppm)	Kadar yang terukur (ppm)	% <i>Recovery</i>	Rerata tiap komposisi	Rerata
80%	1	8,05	8,23	102,23	99,53%	99,45%
	2	8,18	8,06	98,52		
	3	8,13	7,95	97,83		
100%	1	10,04	10,02	99,83	99,18%	
	2	10,36	10,33	99,74		
	3	10,30	10,09	97,98		
120%	1	11,81	12,06	102,17	99,63%	
	2	12,12	11,87	97,95		
	3	12,10	11,95	98,78		

Dari hasil perhitungan didapatkan bahwa rata-rata persen perolehan kembali adalah 99,45%. Persen perolehan kembali replikasi tiap komposisi dan rata-rata persen perolehan kembali telah memenuhi persyaratan akurasi yaitu antara 97-103% (Yuwono dan Indrayanto, 2005).

5.4 Presisi

a. *Repeatability*

Dilakukan pengukuran larutan pada butir 4.3.7 yang mengandung prednison dalam komposisi 100% dengan replikasi sebanyak enam kali. Hasil perhitungan dapat dilihat pada tabel berikut ini :

Tabel V.3 Data hasil *repeatability*

Replikasi	Kadar yang ditambahkan (ppm)	Kadar yang terukur (ppm)	% <i>Recovery</i>
1	9,84	9,76	99,15
2	10,22	10,25	100,27
3	10,52	10,35	98,42
4	10,40	10,21	98,20
5	10,28	10,14	98,66
6	10,22	10,14	99,24
Rata-rata			98,99
SD			0,7479
KV			0,76%

Dari hasil perhitungan didapatkan bahwa nilai KV adalah 0,76%. Nilai KV tersebut telah memenuhi persyaratan *repeatability* yaitu $\leq 2,8\%$ (Yuwono dan Indrayanto, 2005).

b. *Intermediate precision*

Pada hari yang berbeda, dilakukan pengukuran larutan pada butir 4.3.7 yang mengandung prednison dalam komposisi 100% dengan replikasi sebanyak enam kali. Hasil perhitungan dapat dilihat pada tabel berikut ini:

Tabel V.4 Data hasil *intermediate precision*

Repli- -kasi	Hari ke-1			Hari ke-2		
	Kadar yang ditambah- kan (ppm)	Kadar yang terukur (ppm)	% <i>Recovery</i>	Kadar yang ditambah- kan (ppm)	Kadar yang terukur (ppm)	% <i>Recovery</i>
1	9,84	9,76	99,15	10,70	10,53	98,45
2	10,22	10,25	100,27	9,94	9,86	99,15
3	10,52	10,35	98,42	9,76	9,82	100,63
4	10,40	10,21	98,20	10,26	10,03	97,71
5	10,28	10,14	98,66	10,8	10,70	99,11
6	10,22	10,14	99,24	9,94	9,75	98,12
Rata-rata			98,99	Rata-rata		98,86
SD			0,7479	SD		1,0301
KV			0,76%	KV		1,04%

Dari hasil perhitungan didapatkan bahwa nilai kedua KV adalah 0,76% dan 1,04%. Kedua nilai KV tersebut telah memenuhi *intermediate precision* antara yaitu $\leq 3\%$ (Yuwono dan Indrayanto, 2005).

Kemudian dari hasil perhitungan tersebut dilakukan uji Hartley untuk menguji homogenitas variansi. Hasil perhitungan dapat dilihat pada tabel berikut ini:

Tabel V.5 Data hasil uji Hartley

Hari ke-	SD	SD ²	Fmax hitung	Fmax tabel
1	0,7479	0,5593	1,8970	7,2
2	1,0301	1,0611		

Berdasarkan tabel diatas, disimpulkan bahwa tingkat homogenitas presisi yang dihasilkan kedua data tersebut tinggi (data homogen) karena $F_{\max} \text{ hitung} < F_{\max} \text{ tabel}$ (Ott dan Longnecker, 2010).



BAB VI

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan validasi metode spektrofotometri UV-Vis analisis tiga panjang gelombang untuk penetapan kadar tablet prednison yang mengandung zat pewarna. Zat pewarna yang digunakan dalam penelitian ini adalah campuran *light green* dan tartrazin sehingga menghasilkan warna hijau muda.

Berdasar strukturnya, prednison memiliki ikatan rangkap terkonjugasi dan gugus karbonil sebagai gugus kromofor, gugus OH sebagai gugus auksokrom sehingga dapat dianalisis menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Zat pewarna yang digunakan juga memiliki gugus kromofor dan auksokrom, seperti ikatan rangkap terkonjugasi, gugus $-NR_2$, dan gugus SO_3^- pada *light green* dan ikatan rangkap terkonjugasi, gugus azo ($CH_3N=NCH_3$), gugus karboksil ($-COONa$), gugus $-OH$ dan gugus $-SO_3Na$ pada tartrazin. Dengan adanya gugus-gugus tersebut maka apabila dilakukan analisis kadar tablet prednison menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum prednison, serapan dari zat pewarna akan mempengaruhi hasil pengukuran. Profil spektra UV-Vis dari *light green* (Gambar 2.5) dan tartrazin (Gambar 2.8) dalam pelarut metanol memiliki puncak serapan pada panjang gelombang yang mendekati panjang gelombang maksimal prednison. Untuk mengatasi gangguan serapan yang ditimbulkan oleh zat pewarna, maka digunakan analisis kuantitatif dengan cara pengamatan tiga panjang gelombang. Keuntungan analisis kuantitatif teknik tiga panjang gelombang adalah dapat digunakan untuk analisis zat yang terganggu dengan adanya zat lain dalam campuran sehingga dapat mengurangi kesalahan pengamatan (Mulja dan

Suharman, 1995). Metode spektrofotometri UV-Vis terpilih karena waktu analisis yang lebih singkat dan biaya operasional yang lebih rendah namun tetap memberikan ketepatan yang cukup tinggi (Skoog *et al.*, 2007; Amalia *et al.*, 2011; Djalil *et al.*, 2014).

Validasi metode analisis untuk penetapan kadar prednison dalam tablet termasuk kategori satu karena merupakan prosedur analisis kuantitatif untuk bahan aktif dalam sediaan obat (Depkes RI, 2014). Sehingga parameter validasi yang perlu ditentukan adalah selektivitas, linieritas, akurasi dan presisi (Depkes RI, 2014).

Selektivitas ditentukan untuk mengetahui bahwa metode yang digunakan dapat membedakan analit dari komponen lain yang berada di dalam matrik sampel. Untuk menetapkan 3 panjang gelombang terpilih, dibuat larutan baku tunggal yaitu larutan baku prednison 10,0 ppm, larutan baku *light green* 0,1 ppm dan larutan baku tartrazin 0,1 ppm. Masing-masing larutan baku tersebut diamati spektrumnya pada lamda 200 – 400 nm dengan blanko metanol dan kemudian dilakukan *overlay* spektra (Gambar 5.1). Teknik tiga panjang gelombang dipilih pada λ maksimal prednison dan ± 4 nm sebelum dan sesudah λ maksimal dengan pertimbangan bahwa pada daerah tersebut serapan *light green* dan tartrazin relatif datar. Panjang gelombang terpilih adalah 234 nm, 238 nm (panjang gelombang maksimum dari prednison) dan 242 nm.

Setelah menentukan tiga panjang gelombang terpilih, kemudian dilakukan linieritas. Linieritas dilakukan dengan cara membuat larutan baku prednison dengan tujuh konsentrasi yang berbeda (5,0 - 17,0 ppm) yang dicampur dengan larutan baku *light green* dan larutan baku tartrazin dengan tujuh konsentrasi yang berbeda pula (0,05 – 0,17 ppm) dan diamati serapannya pada tiga panjang gelombang terpilih. Serapan yang dihasilkan

kemudian dimasukkan ke dalam rumus untuk mendapatkan Δ serapan. Dilakukan perhitungan persamaan regresi dengan konsentrasi prednison sebagai sumbu x dan Δ serapan sebagai sumbu y (Gambar 5.2). Dari hasil perhitungan didapatkan persamaan regresi adalah $y = 0,0015x - 0,0007$ dengan nilai koefisien korelasi (r) = 0,9997. Pada penelitian penetapan kadar prednison dalam tablet dengan menggunakan KCKT didapatkan persamaan regresi $y = 20,315x - 2,49$ dengan nilai koefisien korelasi (r) = 0,9993, sedangkan pada penelitian yang dilakukan Singh dan Verma menggunakan spektrofotometri didapatkan persamaan regresi $y = 0,02215x - 0,12167$ dengan nilai koefisien korelasi (r) = 0,9998 (Santoro *et al.*, 1993; Singh dan Verma, 2008). Ketiga hasil tersebut sama-sama memenuhi persyaratan linieritas karena nilai koefisien korelasi lebih tinggi dari 0,999 (Yuwono dan Indriyanto, 2005). Persamaan regresi dari hasil perhitungan digunakan untuk menghitung parameter linieritas lain, yaitu V_{x_0} dan X_p , diperoleh V_{x_0} sebesar 1,18%. Nilai V_{x_0} tersebut juga memenuhi syarat linieritas karena nilai V_{x_0} lebih kecil dari 5% (Yuwono dan Indriyanto, 2005). Nilai X_p diperoleh sebesar 0,81 ppm. Nilai X_p tersebut juga memenuhi syarat linieritas karena nilainya lebih rendah dari konsentrasi terkecil yang digunakan untuk linieritas (Yuwono dan Indriyanto, 2005). Berdasar tiga hasil parameter tersebut dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan yang linier antara konsentrasi dan Δ serapan. Semakin tinggi konsentrasi maka Δ serapan yang dihasilkan juga semakin tinggi, sehingga dapat digunakan untuk penetapan kadar.

Penentuan akurasi dilakukan dengan menggunakan metode *spiked-placebo* yaitu penambahan larutan baku prednison dengan tiga komposisi yang berbeda (80%, 100% dan 120%) pada plasebo dengan replikasi tiga kali tiap komposisi. Akurasi ditentukan untuk mengetahui tingkat kedekatan

antara hasil pengujian dengan prosedur yang sedang divalidasi terhadap nilai benar. Akurasi dinyatakan dengan % *recovery* atau persen perolehan kembali yang didapatkan dari perbandingan dalam bentuk persen antara konsentrasi prednison yang diperoleh dari hasil pengamatan dengan konsentrasi prednison yang ditambahkan sesungguhnya. Kandungan prednison tiap tablet adalah 5 mg, sedangkan berat rata-rata tablet berdasarkan hasil keseragaman bobot adalah 207,8 mg, sehingga syarat % perolehan kembali yang dipakai adalah 97-103% karena kandungan analit dalam sampel adalah 2,4% (Yuwono dan Indriyanto, 2005). Hasil rata-rata % perolehan kembali pada komposisi 80%, 100% dan 120% berturut-turut adalah 99,53%, 99,18% dan 99,63%, sehingga rata-rata % perolehan kembali adalah 99,45%. Untuk rata-rata % perolehan kembali tiap komposisi dan rata-rata % perolehan kembali semuanya memenuhi persyaratan akurasi untuk validasi yaitu berada pada rentang 97-103% (Yuwono dan Indriyanto, 2005). Pada penelitian menggunakan KCKT didapatkan rata-rata persen perolehan kembali sebesar 97,91% (Santoro *et al.*, 1993). Kedua hasil tersebut sama-sama memenuhi persyaratan akurasi karena % perolehan kembali berada pada rentang 97-103% (Yuwono dan Indriyanto, 2005).

Penentuan *repeatability* prednison dilakukan dengan menggunakan penambahan larutan baku prednison dengan komposisi 100% ke dalam plasebo dengan replikasi sebanyak enam kali. Syarat koefisien variasi (KV) yang digunakan adalah 2,8% karena kandungan analit dalam sampel adalah 2,4% (Yuwono dan Indriyanto, 2005). Didapatkan nilai koefisien variasi adalah 0,76%. Pada penelitian penetapan kadar prednison dalam tablet dengan spektrofotometri setelah prednison direaksikan dengan FeCl_3 dan $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ diperoleh nilai KV = 0,30%, dan pada penelitian penetapan

kadar prednison dalam tablet menggunakan KCKT diperoleh nilai $KV = 0,55\%$ (Singh dan Verma, 2008; Santoro *et al.*, 1993). Namun analisis kuantitatif teknik tiga panjang gelombang memiliki kelebihan analisis lebih cepat, lebih mudah dan lebih murah daripada menggunakan reaksi warna dengan $FeCl_3$ dan $K_4Fe(CN)_6$ atau menggunakan KCKT (Mulja dan Suharman, 1995; Singh dan Verma, 2008; Skoog *et al.*, 2007; Khosayand *et al.*, 2010).

Selain *repeatability*, dilakukan juga presisi antara (*intermediate precision*) menggunakan metode yang sama namun dilakukan di hari yang berbeda. Didapatkan nilai KV hari pertama dan hari kedua adalah 0,76% dan 1,04%. Kedua nilai KV tersebut telah memenuhi persyaratan presisi antara karena kurang dari 3% (Yuwono dan Indriyanto, 2005). Untuk menguji homogenitas variansi antar kedua data, dilakukan uji Hartley dan didapatkan F_{max} hitung adalah 1,8970 sedangkan F_{max} tabel adalah 7,2 dengan tingkat kepercayaan 95%. Berdasarkan uji Hartley tersebut dapat disimpulkan bahwa tingkat presisi yang dihasilkan kedua data tersebut tinggi karena F_{max} hitung kurang dari F_{max} tabel (Ott dan Longnecker, 2010).

Berdasarkan hasil penelitian, maka proses validasi metode spektrofotometri UV-Vis analisis tiga panjang gelombang untuk penetapan kadar tablet prednison yang mengandung zat pewarna memenuhi persyaratan parameter validasi selektivitas, linieritas, akurasi dan presisi (*repeatability* dan *intermediate precision*).

BAB 7

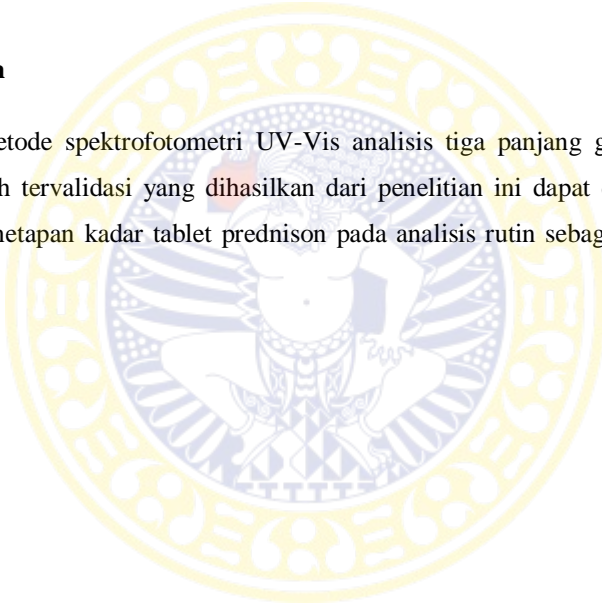
KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Metode spektrofotometri UV-Vis analisis tiga panjang gelombang untuk penetapan kadar tablet prednison yang mengandung zat pewarna memenuhi persyaratan selektivitas, linieritas, akurasi dan presisi.

7.2 Saran

Metode spektrofotometri UV-Vis analisis tiga panjang gelombang yang telah tervalidasi yang dihasilkan dari penelitian ini dapat digunakan untuk penetapan kadar tablet prednison pada analisis rutin sebagai kontrol kualitas.



DAFTAR PUSTAKA

- Adhitya, R.L., 2012. ***Analisis Rata-rata Total Harga Obat Asma Per Hari pada Penderita Asma Bronchiale pada Berbagai Kelas Rawat Inap di Rumah Sakit Swasta X Surabaya Selama Tahun 2011***. Surabaya: Universitas Surabaya.
- Agilent Technologies. 2014. The Diode Array Advantages. Diakses dari <http://www.agilent.com>, diakses pada tanggal 14 Desember 2015.
- Allen, L.V., Levinson, R.S., and Martono, D.D., 1977. Dissolution Rates of Hydrocortisone and Prednisone Utilizing Sugar Solid Dispersion Systems in Tablet Form. ***Journal of Pharmaceutical Sciences***, Vol. 67 No. 7, pp. 979-981.
- Amalia, K.R., Sumantri, dan Ulfah, M., 2011. ***Perbandingan Metode Spektrofotometri Ultraviolet (UV) dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) Pada Penetapan Kadar Natrium Diklofenak***. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- Anonim. 2012. ***Farmakologi dan Terapi edisi 5***. Jakarta: Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, hal. 496-516.
- AOAC, 2002. AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanical. ***AOAC Guidelines***, pp. 5-25.
- Cazes, J., 2005. ***Ewings's Analytical Instrumentation Handbook Third Edition***. New York: Marcel Dekker, Inc., pp. 127-139.
- Choi, H., Advantages of Photodiode Array. Diakses dari http://www.hwe.oita-u.ac.jp/kiki/ronnbunn/paper_choi.pdf, diakses pada tanggal 15 Desember 2015.

- Departemen Kesehatan RI (Depkes RI). 1979. ***Farmakope Indonesia III***. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, hal. 6-7.
- Departemen Kesehatan RI (Depkes RI). 2014. ***Farmakope Indonesia V***. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, hal. 52-54, 1053-1054 dan 1669-1673.
- Departemen Kesehatan RI. 2012. ***Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 033 Tahun 2012 Mengenai Bahan Tambahan Pangan***. Jakarta: Direktorat Jendral Pelayanan Kefarmasian dan Alat Kesehatan Departemen Kesehatan RI.
- Dibbern, H.W., Muller. R.M., and Wirbitzki, E., 2002. ***UV and IR Spectra: Pharmaceutical Substances (UV and IR) and Pharmaceutical and Cosmetic Excipients (IR)***. Frankfurt: Editio Cantor Verlag, p. 1337.
- Djalil, A.D., Latifigana, V.F., Isthi, M.R.R., Ayuningsih, H., dan Susanti. 2014. ***Perbandingan Metode Spektrofotometri UV Dan KCKT Untuk Penentuan Kadar Tablet Natrium Diklofenak Dalam Plasma Tikus Wistar Jantan In Vitro***. Purwokerto: Universitas Muhammadiyah Purwokerto.
- Gandjar, I.G. dan Rohman, A., 2012. ***Analisis Obat Secara Spektroskopi dan Kromatografi***. Yogyakarta: Pustaka Pelajar, hal 59-93 dan 468-490.
- Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. ***Majalah Ilmu Kefarmasian*** Vol. 1 No. 3, pp. 117-135.
- International Conference on Harmonisation (ICH), 2005. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. ***ICH Harmonised Tripartite Guidelines***, pp. 1-13.

- Jumiati. 2014. **Kajian Penggunaan Obat Golongan Kortikosteroid pada Pasien Asma Dewasa di Instalasi Rawat Inap RSUD Pandanarang Boyolali Periode 2013**. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Katzung, B.G., Masters, S.B., and Trevor, A.J., 2012. **Basic & Clinical Pharmacology 12th Edition**. San Francisco: The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Khoshayand, M.R., Abdollahi, H., Ghaffari, A., Shariatpanahi, M., and Farzanegan, H., 2010. Simultaneous Spectrophotometric Determination of Paracetamol, Phenylephrine and Chlorpheniramine in Pharmaceuticals Using Chemometric Approaches. **Daru**, Vol. 18 No. 3, pp. 292-297.
- Li, F., Jin, L., Han, J., Wei, M., and Li, C., 2009. Synthesis and Controlled Release Properties of Prednisone Intercalated Mg-Al Layered Double Hydroxide Composite. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Vol. 48, pp. 5590-5597.
- McGhee, C.N.J., Dean, S., and Meyer, H.D., 2002. Locally Administered Ocular Corticosteroid: Benefits and Risks. **Drug Safety**, pp. 33-55.
- Mulja, M. dan Suharman. 1995. **Analisis Instrumental**. Surabaya: Airlangga University Press, hal. 19-48.
- Ott, R. L. and Longnecker, M., 2010. **An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis Sixth Edition**. Belmont: Brooks/Cole, pp 376-381.
- Parikh, K., Hall, M., Mittal, V., Montalbano, A., Gold, J., Mahant, S., Wilson, K. M., and Shah, S. S., 2015. Comparative Effectiveness of Dexamethasone versus Prednisone in Children Hospitalized with Asthma. **The Journal of Pediatrics**, Vol. 167 No. 3, pp. 639-643.

- Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., and Vyvyan, J. R., 2009. ***Introduction to Spectroscopy 4th Edition***. Belmont: Brooks/Cole, pp. 381-413.
- Riyanto. 2014. ***Validasi & Verifikasi Metode Uji: Sesuai dengan ISO/IEC 17025 Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi***. Yogyakarta: Deepublish.
- Rowe, R.C., Sheskey, P.J., and Quinn, M.E., 2009. ***Handbook of Pharmaceutical Excipients 6th Edition***. London: Pharmaceutical Press, p. 189.
- Santoro, M.I.R.M., Govato, E.B., and Hackmann, E.R.M., 1993. Determination of Steroid Hormones in Pharmaceutical Preparations by High Performance Liquid Chromatography. ***Analytical Letters***, Vol 25 No. 5, pp. 925-935.
- Setyorini, A., Suandi, I K.G., Sidiartha, I G.L., dan Suryawan, W.B., 2009. Pencegahan Osteoporosis dengan Suplementasi Kalsium dan Vitamin D pada Penggunaan Kortikosteroid Jangka Panjang. ***Sari Pediatri***, Vol. 11, hal. 32-38.
- Singh, D.K. And Verma, R., 2008. Spectrophotometric Determination of Corticosteroids and Its Application in Pharmaceutical Formulation. ***Iranian Journal Of Pharmacology & Therapeutics***, Vol 7 No. 1, pp. 61-65.
- Sitompul, R., 2011. Kortikosteroid dalam Tata Laksana Uveitis: Mekanisme Kerja, Aplikasi Klinis, dan Efek Samping. ***Journal of the Indonesian Medical Association***, Vol. 61, hal. 265-269.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., and Crouch, S.R., 2007. ***Principles of Instrumental Analysis Sixth Edition***. Canada: Thomson Corporation, pp. 367-390.

Sweetman, S.C., 2009. *Martindale: The Complete Drug Reference* **Thirty-sixth edition**. London: Pharmaceutical Press, p. 11.

Yuwono, M. and Indrayanto, G., 2005. Validation of chromatographic methods of analysis. *Profiles of drug substances excipients and related methodology*, Vol. 32, pp. 243-259.

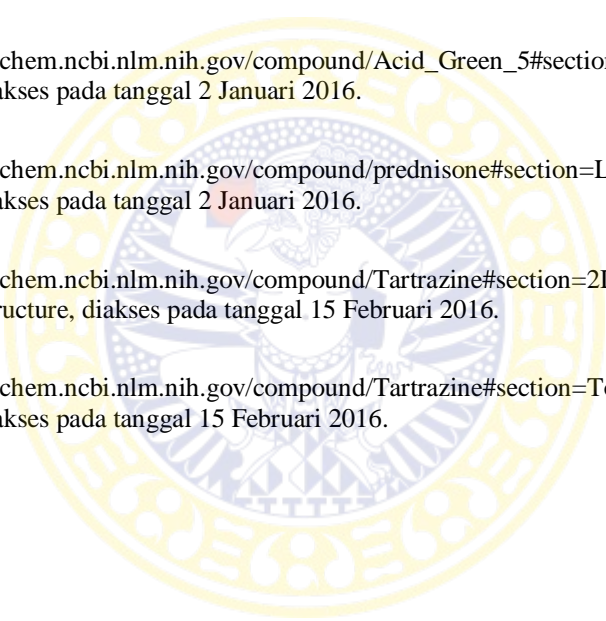
www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acid_Green_5#section=2D-Structure, diakses pada tanggal 2 Januari 2016.

www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acid_Green_5#section=Top, diakses pada tanggal 2 Januari 2016.

www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/prednisone#section=LogP, diakses pada tanggal 2 Januari 2016.

www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tartrazine#section=2D-Structure, diakses pada tanggal 15 Februari 2016.

www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tartrazine#section=Top, diakses pada tanggal 15 Februari 2016.



LAMPIRAN 1

PERHITUNGAN LINIERITAS

Perhitungan persamaan regresi diperoleh dari Δ serapan sebagai y dan konsentrasi sebagai x yang diamati dengan teknik tiga panjang gelombang, dimana perhitungan Δ serapan adalah sebagai berikut:

x konsentrasi (ppm)	Serapan			y Δ serapan
	242 nm	238 nm	234 nm	
5,17	0,2429	0,2430	0,2292	0,0070
6,20	0,3056	0,3062	0,2898	0,0085
7,24	0,3470	0,3485	0,3296	0,0102
10,34	0,5195	0,5226	0,4956	0,0151
12,41	0,6205	0,6238	0,5915	0,0178
14,48	0,7148	0,7196	0,6830	0,0207
17,58	0,8744	0,8803	0,8349	0,0257

Contoh perhitungan Δ serapan pada konsentrasi 5,17 ppm:

$$\begin{aligned}
 \Delta A &= A_2 - \frac{(\lambda_1 - \lambda_2)A_3 + (\lambda_2 - \lambda_3)A_1}{(\lambda_1 - \lambda_2) + (\lambda_2 - \lambda_3)} \\
 &= 0,2430 - \frac{(242 - 238)0,2292 + (238 - 234)0,2429}{(242 - 238) + (238 - 234)} \\
 &= 0,0070
 \end{aligned}$$

Diperoleh persamaan regresi: $y = 0,0015x - 0,0007$ dengan koefisien korelasi (r) = 0,9997.

Persamaan regresi yang diperoleh digunakan untuk menghitung nilai V_{xo} dan X_p . Perhitungan nilai V_{xo} dan X_p adalah sebagai berikut:

x	\bar{x}^2	y_i	\bar{y}_i	$(y_i - \bar{y}_i)^2$
5,17	26,73	0,0070	0,0070349	0,0000000072
6,20	38,44	0,0085	0,0085733	0,0000000054
7,24	52,42	0,0102	0,0101266	0,0000000054
10,34	106,92	0,0151	0,0147567	0,00000000860
12,41	154,01	0,0178	0,0178483	0,0000000023
14,48	209,67	0,0207	0,0209400	0,00000000576
17,58	309,06	0,0257	0,0255701	0,0000000064
$\sum x = 73,42$	$\sum = 897,24$	$\sum y_i = 0,1049$		$\sum = 0,0000001704$

$$\begin{aligned}
 S_y &= \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y}_i)^2}{N-2}} \\
 &= \sqrt{\frac{0,0000001704}{7-2}} \\
 &= 0,0002
 \end{aligned}$$

$$S_{x_0} = \frac{S_y}{b}$$

$$= \frac{0,0002}{0,0015}$$

$$= 0,1236$$

$$V_{x_0} = \frac{S_{x_0}}{\bar{x}} \times 100\%$$

$$= \frac{0,1236}{10,49} \times 100\%$$

$$= 1,18\%$$

$$Q_{xx} = \sum X_i^2 - \frac{1}{N} \left(\sum X_i \right)^2$$

$$= 897,24 - \left(\frac{1}{7} \cdot 5390,50 \right)$$

$$= 127,1661$$

$$Y_p = a + S_y t_{\text{table}} \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{\bar{x}^2}{Q_{xx}}}$$

$$= -0,0007 + 0,0002 \cdot 2,3646 \sqrt{\frac{1}{7} + 1 + \frac{110,0101}{127,1661}}$$

$$= -0,0001$$

$$X_p = 2S_{x_0} t_{table} \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{(Y_p - \bar{y})^2}{b^2 Q_{xx}}}$$

$$= -2.0,1236.2,3646 \sqrt{\frac{1}{7} + 1 + \frac{(-0,0001-0,0150)^2}{0,0015^2.127,1661}}$$

$$= 0,8143 \text{ ppm}$$



LAMPIRAN 2
HASIL KESERAGAMAN BOBOT

No	Berat sampel (mg)
1	209,3
2	208,5
3	207,0
4	208,2
5	209,0
6	206,2
7	206,1
8	209,3
9	209,5
10	209,2
11	206,5
12	207,9
13	206,4
14	207,0
15	206,4
16	208,2
17	207,4
18	208,4
19	207,5
20	208,3
Rata-rata	207,815
SD	1,142608

LAMPIRAN 3

PERHITUNGAN AKURASI

Akurasi dinyatakan dengan % perolehan kembali (*recovery*). Nilai % *recovery* prednison dilakukan dengan memasukkan Δ serapan pada persamaan regresi linier untuk mendapatkan kadar perolehan kembali. Contoh perhitungan kadar perolehan kembali pada komposisi 100% adalah sebagai berikut:

Keterangan	Kadar yang ditambahkan (ppm)	Δ serapan	Kadar yang diperoleh (ppm)
Replikasi 1	10,04	0,0144	10,02
Replikasi 2	10,36	0,0148	10,33
Replikasi 3	10,30	0,0145	10,09

Persamaan regresi linier: $y = 0,0014x - 0,0001$

Kadar perolehan kembali digunakan untuk menghitung % *recovery*. Perhitungan % *recovery* adalah sebagai berikut:

$$R = \frac{C_{sp}}{C_s} \times 100\%$$

$$\% \text{ recovery replikasi 1} = \frac{10,02}{10,04} \times 100\% = 99,83\%$$

$$\% \text{ recovery replikasi 2} = \frac{10,33}{10,36} \times 100\% = 99,74\%$$

$$\% \text{ recovery replikasi 3} = \frac{10,09}{10,30} \times 100\% = 97,98\%$$

$$\% \text{ recovery} = \frac{(99,83\% + 99,74\% + 97,98\%)}{3} = 99,18\%$$

LAMPIRAN 4

PERHITUNGAN PRESISI

Penentuan koefisien variasi (KV) berdasarkan % *recovery* yang dilakukan dalam enam replikasi. Nilai KV dihitung dengan rumus:

$$KV = \frac{SD}{x} \times 100\%$$

Keterangan:

KV : Koefisien variasi
 SD : Standar deviasi dari % *recovery*
 x : Rata – rata % *recovery*

Perhitungan nilai KV adalah sebagai berikut:

Replikasi	Kadar yang ditambahkan (ppm)	Kadar yang terukur (ppm)	% <i>Recovery</i>
1	9,84	9,76	99,15
2	10,22	10,25	100,27
3	10,52	10,35	98,42
4	10,40	10,21	98,20
5	10,28	10,14	98,66
6	10,22	10,14	99,24
Rata-rata			98,99
SD			0,7479

Persamaan regresi linier: $y = 0,0014x - 0,0005$

$$KV = \frac{SD}{x} \times 100\%$$

$$= \frac{0,7479}{98,99} \times 100\% = 0,76\%$$

LAMPIRAN 5**t TABEL**

Pr df	0.25	0.10	0.05	0.025	0.01	0.005
	0.50	0.20	0.10	0.050	0.02	0.010
1	1.00000	3.07768	6.31375	12.70620	31.82052	63.65674
2	0.81650	1.88562	2.91999	4.30265	6.96456	9.92484
3	0.76489	1.63774	2.35336	3.18245	4.54070	5.84091
4	0.74070	1.53321	2.13185	2.77645	3.74695	4.60409
5	0.72669	1.47588	2.01505	2.57058	3.36493	4.03214
6	0.71756	1.43976	1.94318	2.44691	3.14267	3.70743
7	0.71114	1.41492	1.89458	2.36462	2.99795	3.49948
8	0.70639	1.39682	1.85955	2.30600	2.89646	3.35539
9	0.70272	1.38303	1.83311	2.26216	2.82144	3.24984
10	0.69981	1.37218	1.81246	2.22814	2.76377	3.16927
11	0.69745	1.36343	1.79588	2.20099	2.71808	3.10581
12	0.69548	1.35622	1.78229	2.17881	2.68100	3.05454
13	0.69383	1.35017	1.77093	2.16037	2.65031	3.01228
14	0.69242	1.34503	1.76131	2.14479	2.62449	2.97684
15	0.69120	1.34061	1.75305	2.13145	2.60248	2.94671
16	0.69013	1.33676	1.74588	2.11991	2.58349	2.92078
17	0.68920	1.33338	1.73961	2.10982	2.56693	2.89823
18	0.68836	1.33039	1.73406	2.10092	2.55238	2.87844
19	0.68762	1.32773	1.72913	2.09302	2.53948	2.86093
20	0.68695	1.32534	1.72472	2.08596	2.52798	2.84534
21	0.68635	1.32319	1.72074	2.07961	2.51765	2.83136
22	0.68581	1.32124	1.71714	2.07387	2.50832	2.81876
23	0.68531	1.31946	1.71387	2.06866	2.49987	2.80734
24	0.68485	1.31784	1.71088	2.06390	2.49216	2.79694
25	0.68443	1.31635	1.70814	2.05954	2.48511	2.78744
26	0.68404	1.31497	1.70562	2.05553	2.47863	2.77871
27	0.68368	1.31370	1.70329	2.05183	2.47266	2.77068
28	0.68335	1.31253	1.70113	2.04841	2.46714	2.76326
29	0.68304	1.31143	1.69913	2.04523	2.46202	2.75639
30	0.68276	1.31042	1.69726	2.04227	2.45726	2.75000

LAMPIRAN 6**Fmax TABEL MENURUT UJI HARTLEY**

Nilai yang berada di atas adalah untuk $\alpha = 0,05$ dan nilai yang berada di bawah untuk $\alpha = 0,01$

DF (n-1)	Jumlah perlakuan (k)							
	2	3	4	5	6	7	8	9
2	39.0 199	87.5 448	142 729	202 1036	266 1362	333 1705	403 2063	475 2432
3	15.4 47.5	27.8 85.0	39.2 120	50.7 151	62.0 184	72.9 216	83.5 249	93.9 281
4	9.6 23.2	15.5 37.0	20.6 49.0	25.2 59	29.5 69	33.6 79	37.5 89	41.1 97
5	7.2 14.9	10.8 22.0	13.7 28.0	16.3 33	18.7 38	20.8 42	22.9 46	24.7 50
6	5.82 11.1	8.38 15.5	10.4 19.1	12.1 22	13.7 25	15.0 27	16.3 30	17.5 32
7	0.99 8.89	6.94 12.1	8.44 14.5	9.70 16.5	10.8 18.4	11.8 20	12.7 22	13.5 23
8	4.43 7.50	6.00 9.90	7.18 11.7	8.12 13.2	9.03 14.5	9.78 15.8	10.5 16.9	11.1 17.9
9	4.03 6.54	5.34 8.50	6.31 9.9	7.11 11.1	7.80 12.1	8.41 13.1	8.95 13.9	9.45 14.7
10	3.72 5.85	4.85 7.40	5.67 8.6	6.34 9.6	6.92 10.4	7.42 11.1	7.87 11.8	8.28 12.4
20	2.46 3.32	2.95 3.8	3.29 4.3	3.54 4.6	3.76 4.9	3.94 5.1	4.10 5.3	4.24 5.5
30	2.07 2.63	2.40 3.0	2.61 3.3	2.78 3.4	2.91 3.6	3.02 3.7	3.12 3.8	3.21 3.9
60	1.67 1.96	1.85 2.2	1.96 2.3	2.04 2.4	2.11 2.4	2.17 2.5	2.22 2.5	2.26 2.6
∞	1.00 1.00	1.00 1.00	1.00 1.00	1.00 1.00	1.00 1.00	1.00 1.00	1.00 1.00	1.00 1.00

LAMPIRAN 7

SERTIFIKAT ANALISIS PREDNISON

Date: 2019-07-09

天津天药药业股份有限公司
TIANJIN TIANYAO PHARMACEUTICALS CO., LTD.

CERTIFICATE OF ANALYSIS


Product	Batch/lot	Manufacturing date	Page 1/1			
Batch No.	190701001	Batch date	2019-07-01			
Test results	SP-002	expiry date	2020-07-01			
Item	Specification	Result				
Appearance	A white to cream white, crystalline powder	White crystalline powder				
Storage and	Assay result	107.8 - 108.2%				
Identification	A. IR B. TLC	Positive				
Light absorption	$\lambda_{max} = 410$	2.7				
Refractive optical rotation	$[\alpha]_D^{25} = +150$ 1.00% (w/v) solution at 20°C	2.7				
Reduced viscosity	Acetate ester (viscosity) ≤ 1.00	Complies				
Loss on drying	$\leq 5.0\%$	4.9%				
Water	$99.0\% - 100.0\%$	99.8%				
Purity test	monomer	Complies				
Water test	100.00%					
1. Assay	100 mg					
Conclusion	The above product conforms to SP-002.					
Major comment: None. A confirmed control and positive test was						
Validated on the test date.						
Signed by: <i>[Signature]</i>						
Date: 2019-07-09						

TIANJIN TIANYAO PHARMACEUTICALS CO., LTD.

SINA 2019 / 2019 / 1.00

LAMPIRAN 8
SERTIFIKAT ANALISIS *LIGHT GREEN*

by: 0101



PT. RONA LAUTAN PEWAKHA
Jl. Pahlawan 100, RT. 001, RW. 001, Desa, Kecamatan Bontol, Kabupaten
Pangkajene, Sulawesi Selatan
Telp. 081 8887 0000 Fax : 081 8887 0047
Email : rona.lautan.pewakha@gmail.com Web : www.rona.com

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Client Information		Analysis Date		Job No.	
Name: PT. RONA LAUTAN PEWAKHA Address: Jl. Pahlawan 100, RT. 001, RW. 001, Desa, Kecamatan Bontol, Kabupaten Pangkajene, Sulawesi Selatan Phone No.: 081 8887 0000 Email: rona.lautan.pewakha@gmail.com		Date: 10/10/2023 Time: 10:00 AM		Job No.: 0101 Project No.: 0101	
Concentration		Unit		Result	
Parameter: Color Method: Visual Unit: mg/L Result: 1.0 Stability: Good		Unit: mg/L Result: 1.0 Stability: Good		Result: 1.0 Stability: Good	

